

**Dottorato di Ricerca in
Biologia Cellulare e Molecolare**

Ciclo XXIX

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/I1
Settore Scientifico disciplinare: BIO19**

-

**NUOVE STRATEGIE DI REINDIRIZZAMENTO
NEL DISEGNO DI VIRUS HERPES SIMPLEX
ONCOLITICI**

Presentata da: Dott.ssa BILJANA PETROVIC

Coordinatore del Dottorato:

Relatore:

**Chiar.mo Prof.
GIOVANNI CAPRANICO**

**Chiar.ma Prof.ssa
GABRIELLA CAMPADELLI-FIUME**

Abstract

English abstract

Oncolytic virotherapy exploits the ability of viruses to infect and kill cells and is envisioned as treatment for tumors that respond poorly to the current therapeutic approaches. The attenuated herpes simplex virus 1 (HSV-1), named T-Vec, is the only oncolytic virus approved so far for clinical practice. Safety was obtained at the expense of virulence. To overcome the attenuation limits, an alternative strategy consists in altering the host range of a virus. The binding of membrane-bound glycoprotein D (gD) of HSV-1 to one of its receptors activates the downstream glycoproteins gH/gL and gB. The latter executes the fusion virion-cell. So far, gD was the only glycoprotein that successfully enabled the retargeting of HSV-1. The work of this thesis focuses on the development of oncolytic herpes simplex viruses (o-HSVs), retargeted to tumor-specific receptors, in order to bring retargeted o-HSVs to the translational phase. The tropism of HSV-1 has been modified by engineering a heterologous ligand in gH (in virus R-809) or in gB (in R-909). The selected heterologous ligand was a single chain variable fragment antibody (scFv) directed against HER2, a receptor overexpressed in several cancers. The retargeting achieved *via* gB or gH confers to HSV-1 very similar properties to the retargeting achieved *via* gD, in terms of virus growth and oncolytic activity *in vitro*. The changes in gB or gH were combined with those in gD, leading, for the first time, to two HSV-1 simultaneously redirected to two distinct receptors. R-805, directed simultaneously to HER2 and EGFR, has been characterized *in vitro*. An *in vivo* model to study its oncolytic efficacy was developed. R-313 was designed to enable the production of an oncolytic vector into a non-tumor cell line. R-313 is capable to use alternately two receptors, and to infect the tumor cells and the non-tumor-producing cells.

Abstract in italiano

La terapia virale oncolitica sfrutta l'abilità dei virus di infettare e uccidere le cellule e si propone come cura per i tumori che non rispondono agli attuali approcci terapeutici. Un herpes simplex 1 (HSV-1) attenuato, denominato T-Vec, è l'unico virus oncolitico approvato per l'impiego in clinica. In questo virus, la sicurezza è stata ottenuta a spese della virulenza. Per superare i limiti dell'attenuazione, una strategia alternativa è quella di alterare lo spettro d'ospite del virus. Il legame della glicoproteina D (gD) di HSV-1 ad uno dei suoi recettori attiva le glicoproteine gH/gL e gB, che eseguono la fusione. Finora gD è stata l'unica glicoproteina che ha permesso di reindirizzare con successo il tropismo di HSV-1. Il lavoro di questa tesi prevede lo sviluppo di HSV-1 oncolitici, reindirizzati a recettori tumore-specifici, per condurli alla fase traslazionale. Il

tropismo di HSV-1 è stato modificato ingegnerizzando un ligando eterologo in gH (nel virus R-809) o in gB (in R-909). Il ligando eterologo è un frammento anticorpale variabile a catena singola (scFv) diretto contro HER2, recettore sovra-espresso in diversi tumori. Il reindirizzamento ottenuto tramite gB o gH conferisce ad HSV-1 proprietà molto simili al reindirizzamento conseguito tramite gD, in termini di replicazione virale e attività oncolitica *in vitro*. Le modificazioni in gB o gH sono state combinate con quelle in gD, ottenendo, per la prima volta, due HSV-1 reindirizzati contemporaneamente verso due recettori distinti. R-805, diretto contemporaneamente verso HER2 ed EGFR, è stato caratterizzato *in vitro* e si è messo a punto un modello *in vivo* col quale studiare la sua efficacia oncolitica. R-313 è risultato in grado di utilizzare alternativamente due recettori, per infettare le cellule tumorali e le cellule produttrici non tumorali, in quanto la produzione di un vettore oncolitico in una linea tumorale non è compatibile con la sperimentazione clinica.

Pubblicazioni

I dati riportati in questa tesi sono presenti nei seguenti:

Articoli

- Retargeting Strategies for Oncolytic Herpes Simplex Viruses. Campadelli-Fiume G, **Petrovic B**, Leoni V, Gianni T, Avitabile E, Casiraghi C, Gatta V. *Viruses*. 2016 February 26;8(3):63.
- The Engineering of a Novel Ligand in gH Confers to HSV an Expanded Tropism Independent of gD Activation by Its Receptors. Gatta V, **Petrovic B**, Campadelli-Fiume G. *PLoS Pathogens*. 2015 May 21;11(5).
- Insertion of a ligand to HER2 in gB retargets HSV tropism and obviates the need for activation of the other entry glycoproteins. **Petrovic B**, Gianni T, Gatta V, and Campadelli-Fiume G. Manoscritto in revisione per la rivista *PLOS Pathogens*.
- A strategy for cultivation of retargeted oncolytic HSVs in non-cancer cells. Leoni V, Gatta V, Casiraghi C, Nicosia A, **Petrovic B**, Campadelli-Fiume G. Accettato per la pubblicazione da Journal of Virology.

Elaborati relativi a congressi

- Chimeric gB re-addresses HSV tropism to HER2 and bypasses the receptor-mediated activation of the upstream glycoproteins gD and gH. **Petrovic B**, Gianni T, Gatta V e Campadelli-Fiume G. Poster presentato al 6° Congresso Europeo in Virologia (ECV) tenutosi ad Amburgo, Germania, Ottobre 2016.
- Novel retargeting strategy for o-HSVs based on scFv engineering in gH and double retargeted o-HSVs. Gatta V, **Petrovic B** e Campadelli-Fiume G. Poster presentato al 9th International Conference on Oncolytic Virus Therapeutics, tenutosi a Boston, USA, Giugno 2015.
- HSV as platform for the generation of retargeted, armed, and reporter-expressing oncolytic viruses. Menotti L, Avitabile E, Gatta V, **Petrovic B** e Campadelli-Fiume G. Poster presentato al Retreat Scientifico del FABIT, Università di Bologna, febbraio 2017.

Richiesta di brevetto europeo

EP 16173830.7 dal titolo “HSV retargeting through genetic modifications of gB”. Richiesta di brevetto depositata nel giugno 2016.

Sommario

1. INTRODUZIONE	7
1.1 LA FAMIGLIA DEGLI HERPESVIRIDAE E LA SUA CLASSIFICAZIONE	7
1.2 HERPES SIMPLEX VIRUS 1	9
1.2.1 Storia naturale dell'infezione.....	9
1.2.2 Struttura del virione.....	10
1.2.3 Organizzazione strutturale e funzionale del genoma.....	11
1.2.4 Ciclo replicativo	13
1.2.5 Infezione latente	15
1.3 PENETRAZIONE DI HSV-1 NELLA CELLULA	15
1.3.1 La glicoproteina gD: struttura e funzione.....	17
1.3.2 Il complesso delle glicoproteine gH/gL: struttura e funzione	19
1.3.3 La glicoproteina B: struttura e funzione	21
1.3.4 La glicoproteina C: struttura e funzione	24
1.4 VIRUS ONCOLITICI	25
1.4.1 Controllo della trascrizione e replicazione virale	27
1.4.2 Reindirizzamento del tropismo virale	28
1.4.3 Potenziamiento.....	29
1.4.4 Schermatura	31
1.5 HSV COME AGENTE ONCOLITICO	32
1.5.1 Vettori oncolitici HSV-1	32
1.5.2 HSV-1 oncolitici non attenuati reindirizzati al tumore.....	34
1.6 I RECETTORI EGFR.....	37
2. SCOPO	41
3.MATERIALI E METODI.....	43
3.1 CELLULE	43
3.1.2 Generazione della linea Vero-GCN4R	44
3.2 PLASMIDI.....	44
3.3 VIRUS DI CONTROLLO	45
3.4 ANTICORPI.....	46
3.5 LA RICOMBINAZIONE GALK	47
3.5.1 Il protocollo.....	48
3.6 RIGENERAZIONE E COLTIVAZIONE DEI VIRUS RICOMBINANTI	58
3.7 IMMUNORIVELAZIONE DELLE GLICOPROTEINE VIRALI	58
3.8 TROPISMO CELLULARE DEI VIRUS RICOMBINANTI.....	59
3.8.1 Infezione di cellule J esprimenti singoli recettori	59
3.8.2 Infezione di cellule umane cancerose HER2 ⁺ e HER2 ⁻	59
3.9 MISURA DELLA REPLICAZIONE VIRALE	59
3.10 BLOCCO DELL'INFEZIONE CON MAB DIRETTI CONTRO HER2, gB, gH o gD	59
3.11 SAGGIO DI CITOTOSSICITÀ CELLULARE	60
3.12 SILENZIAMENTO DELLE INTEGRINE E RT-PCR.....	60
3.13 DISTACCO DI gL DAL COMPLESSO SO GH/gL	61
3.14 SAGGIO DI FUSIONE	61
3.15 MISURA DELLA GRANDEZZA DELLE PLACCHE	61
3.16 ESPERIMENTI IN VIVO	62
3.16.1 Induzione tumorale	62

3.16.2 Efficacia anti-tumorale sulla linea cellulare HT-29	62
4. RISULTATI	63
4.1 REINDIRIZZAMENTO DI HSV-1 TRAMITE LA GLICOPROTEINA gH.....	63
4.1.1 Ingegnerizzazione dei virus ricombinanti R-803 ed R-809.....	63
4.1.2 R-803 ed R-809 sono reindirizzati a cellule che esprimono HER2.....	65
4.1.3 R-809 infetta efficientemente cellule umane HER2 positive	66
4.1.4 R-803 ed R-809 utilizzano HER2 come recettore per l'ingresso nelle cellule.....	67
4.1.5 Replicazione e citotossicità dei virus ricombinanti R-803 ed R-809.....	69
4.2 REINDIRIZZAMENTO SIMULTANEO DI HSV-1 VERSO DUE RECETTORI DISTINTI.....	71
4.2.1 Costruzione e specificità del virus reindirizzato simultaneamente verso i recettori EGFR ed HER2	71
4.2.2 R-805 infetta e uccide efficacemente le linee tumorali umane positive per HER2 ed EGFR	73
4.2.3 Esperimenti di induzione tumorale delle linee MDA-MB-453 ed HT-29 in topi immunodepressi	77
4.2.4 Esperimento di efficacia anti-tumorale del virus oncolitico R-805 sulla linea tumorale umana HT29 in topi atimici CD1 nude.....	79
4.3 REINDIRIZZAMENTO TRAMITE LA GLICOPROTEINA FUSOGENICA gB	80
4.3.1 Ingegnerizzazione dei virus ricombinanti R-903 ed R-909.....	80
4.3.2 R-903 ed R-909 sono reindirizzati a cellule che esprimono HER2.....	81
4.3.3 Replicazione e citotossicità del virus ricombinante R-909.....	83
4.3.4 L'infezione di R-909 è mediata da HER2 e inibita da anticorpi diretti contro gD, gH e gB	86
4.3.5 Ruolo di gD nella fusione cellulare mediata dalle glicoproteine chimeriche gB e gH ..	89
4.3.6 L'ingresso di R-909 non richiede le integrine $\alpha v\beta 6$ o $\alpha v\beta 8$ e non risulta nel distacco di gL dall'eterodimero gH/gL.....	90
4.4 COLTIVAZIONE DI UN HSV-1 ONCOLITICO IN UNA LINEA NON TUMORALE.....	94
4.4.1 Ingegnerizzazione del peptide GCN4 nella glicoproteina gB del virus R-LM113.....	94
4.4.2 Costruzione della linea Vero-GCN4R.....	95
4.4.3 Il duplice tropismo del virus R-313 verso i recettori GCN4R ed HER2.....	97
4.4.4 Replicazione e spread del ricombinante R-313 in Vero-GCN4R e SK-OV-3	99
5. DISCUSSIONE.....	101
5.1 REINDIRIZZAMENTO DI HSV-1 TRAMITE LA GLICOPROTEINA gH.....	102
5.2 REINDIRIZZAMENTO SIMULTANEO DI HSV-1 VERSO DUE DISTINTI RECETTORI.....	104
5.3 REINDIRIZZAMENTO DI HSV-1 TRAMITE LA GLICOPROTEINA FUSOGENICA gB	104
5.4 COLTIVAZIONE DI UN HSV-1 ONCOLITICO IN UNA LINEA NON TUMORALE.....	107
6. BIBLIOGRAFIA	110

1. Introduzione

1.1 La famiglia degli *Herpesviridae* e la sua classificazione

Gli herpesvirus, di cui sono note circa 200 specie, sono molto diffusi in natura e colonizzano la maggior parte delle specie animali (1). Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, i virus appartenenti alla famiglia degli *Herpesviridae* infettano il 90% della popolazione terrestre. Sono dunque importanti patogeni responsabili di una varietà di patologie molto diffuse nella popolazione umana. Finora, sono stati isolati nove herpesvirus umani, elencati nella tabella 1.1. Negli ultimi venti anni, la ricerca si è focalizzata sul potenziale terapeutico degli herpesvirus come vettori nella terapia genetica (2, 3) e come agenti oncolitici nella terapia antitumorale. Il T-Vec, un herpes simplex virus 1, è stato il primo agente oncolitico virale ad essere approvato per l'uso in clinica negli USA e in Europa per il trattamento del melanoma avanzato (4).

Tabella 1.1- Herpesvirus umani (1).

Nome scientifico	Nome comune	Sottofamiglia	Grandezza del genoma (bp)	Abbreviazione
<i>Human herpesvirus 1</i>	Herpes simplex virus 1	α	152	HHV-1 (HSV-1)
<i>Human herpesvirus 2</i>	Herpes simplex virus 2	α	152	HHV-2 (HSV-2)
<i>Human herpesvirus 3</i>	Varicella-zoster virus	α	125	HHV-3 (VZV)
<i>Human herpesvirus 4</i>	Epstein-Barr virus	γ	172	HHV-4 (EBV)
<i>Human herpesvirus 5</i>	Cytomegalovirus	β	229	HHV-5 (HCMV)
<i>Human herpesvirus 6A</i>		β	162	HHV-6A
<i>Human herpesvirus 6B</i>		β	162	HHV-6B
<i>Human herpesvirus 7</i>		β	153	HHV-7
<i>Human herpesvirus 8</i>	Virus del sarcoma di Kaposi	γ	230	HHV-8 (KSHV)

I virus appartenenti alla famiglia degli *Herpesviridae* condividono quattro fondamentali caratteristiche biologiche (1).

1. Ognuno codifica un vasto corredo enzimatico responsabile del metabolismo degli acidi nucleici, della sintesi del DNA (DNA polimerasi, elicasi) e del processamento delle proteine.
2. La sintesi del DNA virale avviene nel nucleo delle cellule infette, così come l'assemblaggio del capsido, mentre la formazione dell'envelope inizia a livello della membrana nucleare.
3. La produzione della progenie virale infettante è sempre associata alla lisi della cellula infetta.

4. Tutti i virus sono in grado di instaurare un'infezione latente all'interno dell'ospite. In questo caso il genoma assume una forma circolare chiusa e sono espressi solo pochi geni. Il virus è in grado di riattivarsi a seguito di diversi stimoli, quali stress fisico o emozionale, febbre, raggi ultravioletti e danno tissutale.

Sono state identificate, in base a caratteristiche biologiche comuni, tre sottofamiglie di *Herpesviridae*. Differiscono per la tipologia delle cellule bersaglio, per la velocità del ciclo replicativo e per la sede di latenza (1).

Alphaherpesvirinae: virus di questa sottofamiglia sono caratterizzati da un ampio spettro d'ospite, un breve ciclo riproduttivo, una rapida diffusione in colture cellulari e dall'abilità di stabilire un'infezione latente principalmente nei gangli sensoriali. Appartengono a questa sottofamiglia specie importanti da un punto di vista clinico umano, come l'*herpes simplex virus* 1 e 2, agenti eziologici rispettivamente dell'herpes labiale e genitale e il *varicella zoster virus* (VZV), la cui infezione causa varicella e, in caso di riattivazione, herpes zoster.

Betaherpesvirinae: la maggior parte dei membri di questa sottofamiglia presenta uno spettro d'ospite molto ristretto, il ciclo riproduttivo è relativamente lungo e la crescita in coltura è molto lenta. La dimensione delle cellule infette aumenta in modo considerevole dando luogo alla cosiddetta citomegalia. Il virus stabilisce la latenza in diversi tipi cellulari, quali ghiandole secretorie, cellule linforeticolari, del rene e di altri tessuti. Le specie di interesse umano appartenenti ai *Betaherpesvirinae* sono il *human cytomegalovirus* (HCMV) e gli *human herpesvirus* 5, 6A, 6B e 7.

Gammapherpesvirinae: i membri di questa sottofamiglia sono specifici per i linfociti T e B e stabiliscono un'infezione latente nei tessuti linfoidi e raramente in cellule epitelioidei e fibroblasti. L'interesse clinico è incentrato sull'*Epstein-Barr virus* (EBV), agente eziologico della mononucleosi, e lo *Human herpesvirus* 8 (HHV-8), associato al linfoma di Burkitt (e il sarcoma di Kaposi).

1.2 *Herpes simplex virus 1*

L'HSV-1 è stato il primo herpes virus umano ad essere scoperto, è considerato il virus prototipo nella famiglia *Herpesviridae* ed è tuttora uno dei virus erpetici più studiati (5). Le sue proprietà biologiche, come la latenza, la capacità di riattivarsi e di provocare diverse infezioni, ne fanno un interessante oggetto di studio. HSV-1 è stato ed è utilizzato tuttora come strumento e modello per lo studio della traslocazione delle proteine, delle connessioni sinaptiche nel sistema nervoso, della struttura della membrana, della regolazione genica, della terapia genica, della terapia del cancro e di molti altri problemi biologici (6).

1.2.1 Storia naturale dell'infezione

L'HSV-1 è diffuso globalmente, in paesi sviluppati e non e non presenta variazioni stagionali. L'essere umano è l'unico *reservoir* noto per la trasmissione di HSV-1. Dato che l'infezione da HSV-1 raramente risulta letale, più della metà della popolazione mondiale presenta infezioni ricorrenti da HSV-1 permettendone in questo modo la diffusione (7).

L'infezione primaria si ha nei bambini e, nei pazienti immunocompetenti, è per lo più asintomatica. La sede iniziale d'infezione è principalmente la mucosa labiale, dove il virus si replica attivamente e dalla quale viene trasportato in direzione retrograda lungo gli assoni ai neuroni dei gangli sensoriali che innervano la mucosa (Fig. 1.1). La replicazione virale ha luogo in una piccola frazione dei neuroni dei gangli sensoriali, mentre nelle altre cellule il genoma virale rimane in uno stato latente (non replicativo) per tutta la vita. Vari stimoli, quali stress fisico o emozionale, febbre, raggi ultravioletti, danno tissutale portano alla riattivazione virale. Nel processo inverso, quindi il virus viene trasportato alle membrane delle mucose, dove replica e produce le vesciche attive per la trasmissione. HSV-1 causa una malattia sintomatica orofaringea caratterizzata da piaghe della mucosa boccale e gengivale (della durata di 2-3 settimane) e da febbre tra i 38 e 40° C. Le manifestazioni cliniche si presentano principalmente a livello della mucosa labiale, del viso, degli occhi, ma in ospiti immunocompromessi le infezioni da HSV-1 possono dar luogo anche a cheratocongiuntiviti, encefaliti o herpes diffusi (8). Il trattamento dell'infezione da HSV consiste nella somministrazione topica, orale o endovenosa di aciclovir (ACV), un profarmaco analogo del nucleoside purina. La timidina chinasi virale attiva l'ACV, che si integra nel DNA virale e agisce come terminatore della catena di DNA nascente, causando il blocco della sintesi di DNA da parte della polimerasi virale. Questo trattamento mantiene sotto controllo i sintomi ed è stato impiegato con successo per il trattamento di diverse infezioni da HSV, come l'encefalite, l'epatite, le infezioni polmonari, proctite o infezioni dell'occhio.



Fig. 1.1 - Progressione dell'infezione da HSV-1. L'infezione primaria da HSV-1 si verifica in corrispondenza della mucosa labiale o dell'occhio. In questa sede, il virus si replica attivamente ed entra nei neuroni che innervano il sito d'ingresso. Il virus è successivamente trasportato ai gangli del trigemino tramite trasporto retrogrado. Durante la fase latente l'espressione dei geni virali è spenta, ad eccezione dei geni LAT (geni associati alla latenza). A seguito di diversi stimoli, il virus va incontro alla riattivazione. In questa fase il virione viaggia in senso anterograde lungo gli assoni dei neuroni verso il sito primario d'infezione.

1.2.2 Struttura del virione

Il virione di HSV-1, del diametro di circa 150-200 nm, consiste di quattro elementi morfologici fondamentali raffigurati in Fig. 1.2 A (9): un nucleo elettro-denso detto nucleocapside, un capside icosaedrico che racchiude il nucleo, un tegumento amorfo ed un rivestimento esterno (*envelope* o pericapside) contenente le glicoproteine coinvolte nell'ingresso del virus nella cellula. Recentemente la struttura del virione di HSV-1 è stata risolta in dettaglio, grazie alla tecnica della tomografia crioelettronica (Fig. 1.2 B-C) (10). Il nucleocapside contiene il genoma DNA a doppio filamento (*double stranded*, DS) (di 152 Kb) in uno stato cristallino liquido; è densamente arrotolato e complessato con le poliammine spermidina e spermina che neutralizzano le cariche negative del DNA e conferiscono una forma toroidale al genoma virale (10). Il capside proteico è composto da 162 capsomeri disposti a simmetria icosaedrica T=16 e uno strato intermedio organizzato in un lattice T=4. Gli strati esterni e intermedi sono organizzati in modo che i canali lungo i loro duplici assi icosaedrici coincidano, formando un potenziale canale tra lo strato di DNA e l'esterno del virione. Il tegumento è composto da almeno 20 proteine virali, tra cui le più importanti vi sono la proteina con funzione trans attivante VP16, chiamata anche α -TIF (α -trans-inducing-factor) e la proteina VHS (*virion host shut-off*), in grado di inibire la sintesi proteica dell'ospite. Il rivestimento più esterno, l'*envelope* (o pericapside), è costituito da un doppio strato lipidico che incorpora circa 12 glicoproteine virali diverse (gB, gC, gD, gE, gH, gI, gJ, gK, gL e gM) il cui numero di copie di ciascuna può superare le mille unità per virione. Tra le 12 glicoproteine, quelle essenziali per l'ingresso di HSV nella cellula sono gD,

gH, gL e gB a cui saranno dedicati specifici paragrafi (1.4.1, 1.4.2 ed 1.4.3) (11). HSV-1 acquisisce i lipidi del rivestimento (*envelope*) dalla cellula, ma il processo attraverso il quale HSV-1 acquista il suo involucro lipidico ha dato luogo a controversie e sarà trattato nei paragrafi successivi (12). Le glicoproteine che sporgono dall'*envelope* sembrano essere disposte in maniera non casuale: sono densamente impacchettate attorno ad un polo della particella virale. Questa distribuzione potrebbe riflettere le associazioni funzionali come il *clustering* locale delle glicoproteine che devono entrare in contatto con diversi recettori cellulari durante l'ingresso nelle cellule (13).

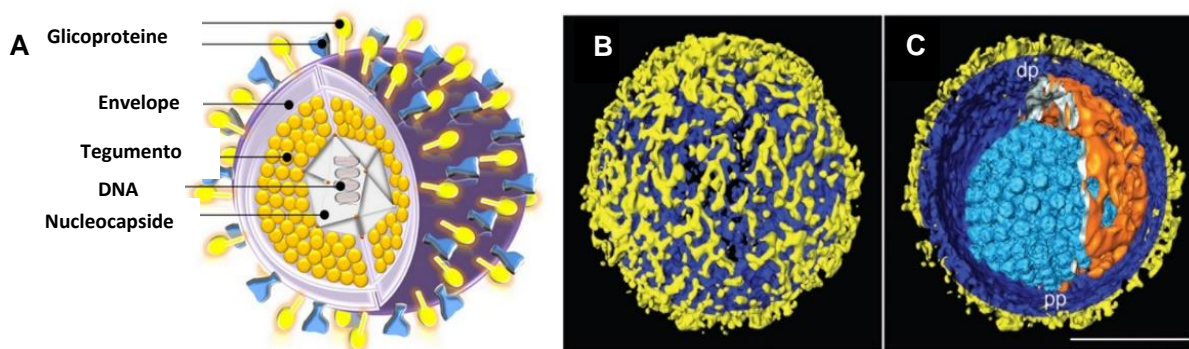


Fig. 1.2 - Struttura dei virioni di HSV-1. A) Rappresentazione schematica del virione di HSV-1 e dei suoi componenti: il nucleocapside contenente il genoma virale circolare dsDNA, il capsidico icosaedrico, il tegumento amorfo e l'*envelope* contenente le glicoproteine virali. B-C) Tomogramma di un singolo virione. B) Superficie esterna del virione con le proteine (in giallo) che protrudono dalla membrana (in blu). C) Sezione del virione. Sono raffigurati il capsidico (in celeste), il tegumento (in arancione) e l'*envelope* (in giallo e blu). La barra della scala, 100 nm (10).

1.2.3 Organizzazione strutturale e funzionale del genoma

Il genoma di HSV-1 (GenBank *accession number* 734771) (Fig.1.3) consiste di una molecola lineare a doppio filamento di DNA di 152 kb con un contenuto di CG pari al 68% (14). Nel virione, il genoma è lineare, ma circolarizza rapidamente dopo l'ingresso nel nucleo della cellula infetta (15, 16).

Il genoma di HSV-1 è costituito da due regioni di sequenze uniche, designate come U_L (L dall'inglese *long*) e U_S (S dall'inglese *short*), fiancheggiate da sequenze ripetute invertite: le ripetizioni della componente L sono indicate come ab e b'a', mentre quelle della componente S a'c' e ca (Fig. 1.3). Nel genoma virale ci sono tre origini di replicazione: ori_L situato in U_L, e due copie di ori_S situate nella regione fiancheggiante U_S. Il genoma di HSV-1 va incontro ad inversioni che generano quattro isomeri in quantità equimolari con le sequenze L ed S invertite l'una rispetto all'altra (15, 17).



Fig. 1.3 - Organizzazione del genoma di HSV-1. Il genoma di HSV-1 consiste di una molecola lineare a doppio filamento di DNA di 152 kb codificante per più di 80 geni. E' suddivisa in una regione a sequenza unica lunga U_L (L dall'inglese *long*) e corta U_S (S dall'inglese *short*), fiancheggiate da regioni ripetute interne IR (*internal repeats*) ed esterne TR (*terminal repeats*). Le sequenze che fiancheggiano la regione U_L sono definite come ab e b'a', mentre quelle che fiancheggiano la regione U_S a'c e ca. All'interno delle sequenze uniche si trovano le origini di replicazione (oriL e oriS).

Il DNA dell'Herpes simplex virus 1 presenta circa 90 unità trascrizionali uniche, codificanti per almeno 84 proteine e diversi miRNA (18, 19). Con rare eccezioni, ogni trascritto virale codifica per una singola proteina e non contiene introni. Diversi trascritti non presentano una ORF (*open reading frame*, quadro di lettura) e tra questi i più studiati sono i trascritti associati alla latenza (LAT). Tra gli 84 geni è importante distinguere tra 38 geni essenziali per la replicazione virale e 46 geni non essenziali o accessori, la cui mancanza non influisce sul processo replicativo (18). I geni essenziali comprendono quelli relativi alle glicoproteine dell'*envelope* B, D, H, L responsabili dell'entrata e penetrazione di HSV-1 nella cellula. Altri geni fondamentali per l'HSV-1 sono quelli che codificano per gli enzimi coinvolti nella replicazione e metabolismo del DNA, quali la timidina chinasi (TK) e la ribonucleotide reduttasi (RR), grazie alle quali il virus è in grado di infettare in modo produttivo anche cellule non in attiva replicazione, come i neuroni. I geni di HSV-1 sono divisi in tre classi temporali, espressi in sequenza: α o precoci immediati, β o precoci e γ o tardivi (Fig. 1.4) (20, 21).

I geni α sono espressi da circa 2 a 4 ore dopo l'infezione. Per l'inizio della loro trascrizione non è richiesta la sintesi proteica, ma è necessaria la presenza della proteina del tegumento VP16 (chiamata anche α -TIF da *Trans Inducing Factor*). I geni precoci immediati (α) codificano per proteine denominate proteine della cellula infetta (ICP) e, ad eccezione di ICP47, i loro prodotti sono proteine trans-attivanti che permettono l'espressione dei geni β e la sovversione del macchinario cellulare a favore del virus. La funzione della proteina ICP47, invece, è quella di down-regolare l'espressione del complesso MHC I coinvolto nella presentazione degli antigeni, è quindi un gene implicato nell'evasione immune di HSV-1 (22).

L'espressione dei geni β ha luogo dalle 4 a 8 ore dopo l'infezione e richiede l'attività di ICP4, che agisce sia da repressore che trans-attivatore (23). I geni β codificano per proteine coinvolte nella replicazione e nel metabolismo del DNA virale, ma anche per proteine trans-attivanti che permettono l'espressione dei geni tardivi γ . Ai geni γ appartengono UL39, la grande subunità della ribonucleotide reduttasi e UL23 che codifica per la timidina chinasi TK.

L'espressione dei geni γ si verifica una volta iniziata la sintesi del DNA virale. I geni γ codificano prevalentemente per proteine strutturali del virione maturo e per le componenti del tegumento. Ne fanno parte, per esempio, i geni UL27 e US6 codificanti per le glicoproteine B e D e il gene γ 34.5 codificante per la proteina ICP34.5. Il prodotto del gene γ 34.5 blocca lo spegnimento della sintesi proteica cellulare innescato dall'infezione virale (24). L'espressione di questa proteina inoltre, facilita la replicazione virale in cellule non in attiva divisione, come i neuroni, contribuendo, per esempio, allo sviluppo di encefaliti (25).

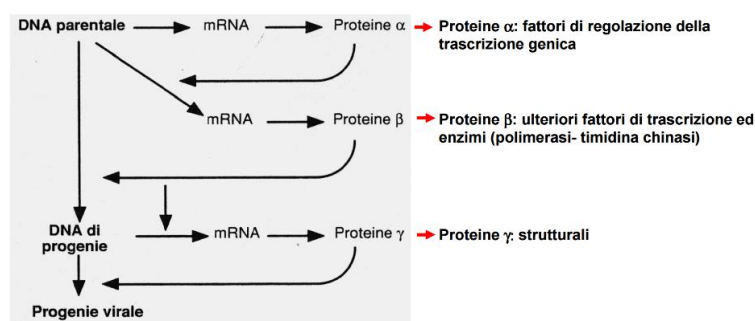


Fig. 1.4 - Rappresentazione schematica della regolazione dell'espressione genica di HSV-1. All'entrata del virus, il genoma virale è accompagnato dalla proteina α -TIF (VP16) che promuove la trascrizione dei geni immediati precoci α , attraverso fattori trascrizionali cellulari. Le proteine precoci immediate sono fattori di regolazione che innescano la sintesi delle proteine precoci β , le quali servono per la replicazione del virus. I geni tardivi γ codificano prevalentemente per proteine del capsido e per le glicoproteine dell'envelope (18).

1.2.4 Ciclo replicativo

Per dare inizio all'infezione, HSV-1 interagisce tramite le glicoproteine dell'*envelope* con i recettori presenti sulla superficie cellulare (11). In seguito al legame con i recettori cellulari, per entrare nelle cellule il virus può seguire due diversi percorsi: il legame ai recettori cellulari può innescare la fusione a livello della membrana plasmatica; in alternativa si ha l'endocitosi del capsido rivestito da *envelope* e la successiva fusione del virus con le membrane delle vescicole endocitiche (26). Il tipo cellulare detta la scelta del percorso di ingresso per il virus. Tuttavia, in molti casi la via preferenziale per ottenere una infezione produttiva sembra essere quella endocitica. Si è scoperto, inoltre, che una molecola di adesione cellulare, l'integrina $\alpha\beta3$, indirizza i virioni di HSV ai cosiddetti *lipid rafts* (zattere ricche in colesterolo) e ad un ingresso dipendente dalla proteina dinamina 2 in compartimenti acidi (via endosomiale) (27, 28). La fase che riguarda l'attacco e la penetrazione dell'HSV-1 sarà trattata in dettaglio nella sezione successiva, in quanto il reindirizzamento del tropismo naturale di HSV-1 costituisce l'argomento centrale di questo studio.

Una volta che il virus penetra nella cellula, il capsido, privato dell'envelope, è rilasciato nel

citoplasma e trasportato, tramite la rete cellulare dei microtubuli, ai pori nucleari dove il DNA è rilasciato nel nucleo e va incontro a circolarizzazione; in questo comparto il genoma virale è trascritto, si replica e sono assemblati i nuovi capsidi. Il DNA virale è trascritto dalla RNA polimerasi II cellulare, con la partecipazione dei fattori virali durante tutte le fasi dell'infezione. La modalità di replicazione è definita “a cerchio rotante” (*rolling circle*) in quanto porta alla formazione di concatenameri in seguito suddivisi in monomeri e impacchettati all'interno dei capsidi. La sintesi dei prodotti genici virali è strettamente regolata, come descritto nella sezione precedente.

Dopo la sintesi delle proteine γ del capside, l'assemblaggio del capside avviene nel nucleo della cellula infetta. La maturazione per aggiunta di proteine del tegumento virali e cellulari e il rivestimento finale invece avvengono nel citoplasma. Pertanto, i capsidi dell'herpesvirus devono attraversare la membrana nucleare. I capsidi di HSV-1 sono caratterizzati da un diametro di circa 125 nm, troppo grande per attraversare i pori nucleari intatti. Sono stati proposti due modelli di uscita del virus (Fig. 1.5) (29, 30):

- il modello del rivestimento singolo (o modello luminale): i virioni acquistano l'envelope per gemmazione del capside a livello della membrana nucleare interna, dopodiché vengono trasportati attraverso il reticolo endoplasmatico e la via secretoria alla superficie delle cellule per il rilascio.
- il pathway del rivestimento-de-rivestimento-ri-rivestimento (o del doppio rivestimento): i capsidi intranucleari acquistano un envelope (primario) per gemmazione alla membrana nucleare interna, portando alla formazione di virioni rivestiti che risiedono nello spazio perinucleare; il loro envelope fonde con la membrana nucleare esterna (de-rivestimento), rilasciando in questo modo il nucleocapside nel citoplasma per l'ulteriore maturazione, come l'acquisizione del tegumento; infine, i virioni vanno incontro ad un rivestimento secondario (ri-rivestimento) nei compartimenti trans-Golgi, o in quelli endosomiali.

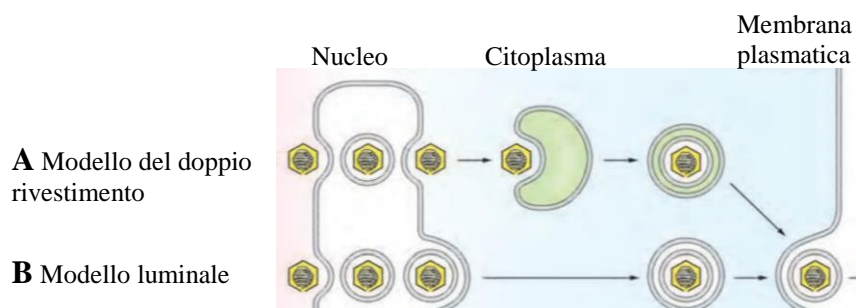


Fig. 1.5 - I modelli di egresso di HSV-1 dalla cellula ospite. Sono raffigurati i due pathway proposti per la maturazione dei capsidi dal nucleo fino alla fuoriuscita del virus dalla cellula infetta. A) Nel modello del doppio rivestimento, i capsidi intranucleari acquistano un envelope (primario) per gemmazione alla membrana nucleare interna, portando alla formazione di virioni rivestiti che risiedono nello spazio perinucleare; il loro envelope fonde

con la membrana nucleare esterna (de-rivestimento), rilasciando in questo modo il nucleocapside nel citoplasma per l'ulteriore maturazione, come l'acquisizione del tegumento; infine, i virioni vanno incontro ad un rivestimento secondario (ri-rivestimento) nei compartimenti trans-Golgi, o in quelli endosomiali. B) Nel modello luminale i virioni acquistano l'envelope per gemmazione del capsido a livello della membrana nucleare interna dopodiché vengono trasportati attraverso il reticolo endoplasmatico e la via secretoria alla superficie delle cellule per il rilascio (29).

1.2.5 Infezione latente

Un'interessante proprietà di HSV-1 è la capacità di stabilire un'infezione latente, in cui non si osserva alcuna replicazione virale. Nelle cellule neuronali, i virioni possono iniziare una replicazione litica o entrare in uno stato di latenza. Cellule neuronali infette in modo latente rimangono vive, e la latenza di HSV-1 persiste per tutta la vita. Nelle cellule neuronali, il genoma virale è mantenuto in forma episomiale, legato agli istoni e mantenuto in uno stato represso ad eccezione dei trascritti associati alla latenza (LAT) e di alcuni microRNA (miRNA) derivati dai trascritti LAT (31). I geni LAT sono localizzati all'interno delle ripetizioni invertite che fiancheggiano la sequenza lunga unica. I trascritti LAT e i miRNA svolgono un ruolo nel mantenimento della latenza ma non nella sua insorgenza (32). Nessuna funzione virale è assolutamente indispensabile per l'instaurarsi della latenza, infatti nessun virus mutante deleto ha manifestato la totale capacità di stabilire la latenza. Diverse evidenze suggeriscono che la latenza sia indotta dall'assenza dell'espressione ad alti livelli dei geni α . A prova di ciò i trascritti LAT sono in grado di down-regolare i geni litici α (33).

1.3 Penetrazione di HSV-1 nella cellula

La seguente sezione si occupa più in dettaglio dell'ingresso di HSV-1 nella cellula, in quanto il reindirizzamento del tropismo naturale di HSV-1 costituisce l'argomento centrale di questo studio. A dispetto dei virus più piccoli provvisti di *envelope*, che possiedono di solito una o due glicoproteine per le funzioni di entrata e di fusione, HSV-1 codifica per un apparato d'ingresso multipartito composto da glicoproteine essenziali distinte (gB, gC, gD, gH/gL), ognuna caratterizzata da un'attività specifica (34, 35) (Fig. 1.6). Il processo di fusione a più fasi, che caratterizza l'entrata di HSV-1, impedisce verosimilmente l'attivazione indiscriminata dell'apparato di fusione (11). Il processo di ingresso del virus si compone di quattro fasi: l'attacco alla membrana cellulare, il riconoscimento del recettore cellulare da parte di una glicoproteina virale, il conseguente innesco della fusione e l'esecuzione della fusione.

La prima interazione tra il virus e la membrana plasmatica delle cellule è rappresentato dal legame di gC e gB ai motivi saccaridici dell'eparan solfato (HS) o condroitinsolfato (36, 37). L'eparan solfato è un membro della famiglia dei glicosaminoglicani (GAG), strettamente

connessi nella struttura all'eparina, e ampiamente distribuiti sulla superficie delle cellule nei mammiferi. Questo legame, non essenziale, migliora l'infettività di HSV-1 ma manca di specificità e verosimilmente contribuisce a formare più punti di adesione alla cellula, concentrando i virioni sulla superficie cellulare. Questo legame è reversibile, e il virus non adeso è ancora infettante. In alcuni tipi cellulari è stato osservato che i virioni si accumulano vicino a delle proiezioni della membrana, denominati filopodi attraverso l'interazione di gB con HS. Da lì, i virioni viaggiano con un movimento laterale lungo la lunghezza dei filopodi per arrivare più vicino al corpo cellulare. Questo fenomeno è stato chiamato *surfing* virale ed è stato riportato incrementare l'efficacia dell'infezione, indirizzando il virus alle regioni di membrana arricchite in recettori (38). Dopo l'attacco virale aspecifico alla membrana cellulare, gD si lega in modo irreversibile a uno dei suoi recettori specifici (39). L'evento chiave che porta all'ingresso di HSV-1 nella cellula ospite è rappresentato proprio dall'interazione della glicoproteina di membrana gD con uno dei suoi specifici recettori cellulari. gD è in grado di legarsi ad almeno tre recettori alternativi: al recettore del fattore di necrosi tumorale HVEM (herpes virus entry mediator), alla molecola di adesione cellulare nectinale ai motivi O-solfatati (3-O-S) dell'eparan solfato. Molti dei recettori sono largamente espressi in un'ampia varietà di tipi cellulari e di tessuti umani (40). Non è chiaro perché HSV si leghi a recettori alternativi. L'affinità gD alla nectinal e all'HVEM è dello stesso ordine di grandezza (10^{-6} M); quindi, l'affinità non è alla base dell'uso preferenziale (39). Presumibilmente questo serve ad aumentare le probabilità di successo di infezione e diffusione nell'ospite umano. Quando gD si lega al suo recettore, subisce un cambiamento conformazionale, che risulta nella attivazione del processo di fusione. Il legame di gD segnala il riconoscimento del recettore e innesca quindi la fusione, trasmettendo il segnale alle altre tre glicoproteine gB, gH, gL. Il trio di gB, gH, gL, esegue la fusione con la membrana plasmatica o con le vescicole endocitiche della cellula bersaglio (41). Il trio gB+gH/gL sembra costituire il meccanismo di fusione conservato all'interno della famiglia degli herpesvirus, in cui gB mostra il più alto grado di conservazione di sequenza. La complessità del meccanismo d'ingresso che non trova esempi simili in altri virus, ha reso difficile la completa comprensione degli eventi che portano alla fusione. gH è stato considerato per un lungo periodo come potenziale fusogeno di HSV-1 ma studi di cristallografia non hanno riscontrato alcuna omologia con la struttura nota di proteine di fusione (42). Il complesso gH/gL, oltre a regolare la fusione, interagisce con le molecole di adesione cellulare, le integrine $\alpha\beta 8$ e $\alpha\beta 6$. $\alpha\beta 8$ e $\alpha\beta 6$ sono richieste per l'ingresso, in quanto la loro deplezione, risulta nel blocco dell'infezione del virus (43). E' stato anche dimostrato che le integrine inducono un cambiamento conformazionale di gH/gL che risulta nel distacco di gL dall'eterodimero (44). Il distacco avviene all'attacco/ingresso e ha luogo solo se tutte le componenti dell'apparato d'ingresso sono presenti;

in particolare richiede la presenza della glicoproteina D attivata da recettore come anche di gB. Diverse evidenze suggeriscono che si tratti di un passaggio nel processo di attivazione di gH/gL. gB è la glicoproteina dell'envelope più conservata all'interno della famiglia degli *Herpesviridae*. La struttura cristallografica di gB è già stata risolta e presenta una notevole omologia con quella della proteina fusogena di VSV (*vesicular stomatitis virus*), gG (45). Considerando la struttura del complesso gH-gL, è probabile che le due glicoproteine attivino gB per la fusione, piuttosto che abbiano un ruolo diretto nel meccanismo. Come esattamente le due glicoproteine cooperino per eseguire la fusione è tuttora materia di dibattito.

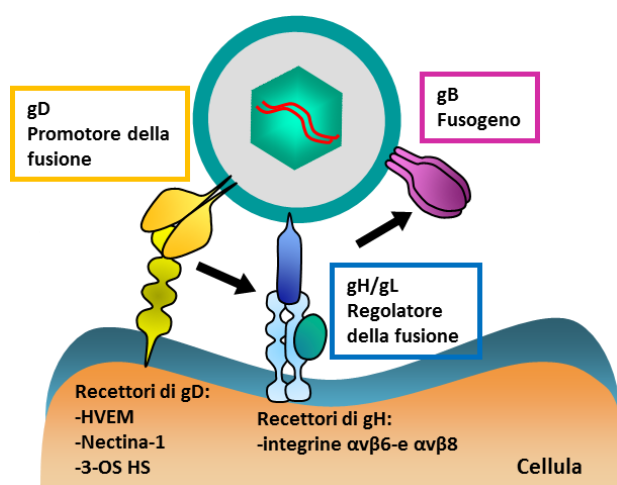


Fig. 1.6 - Il sistema multipartito d'ingresso di HSV-1. gD si lega a tre recettori alternativi nectina1, HVEM, e l'eparan solfato modificato (3-OS HS). Il complesso gH/gL interagisce con la sottofamiglia $\alpha\beta 8$ e $\alpha\beta 6$ delle integrine. $\alpha\beta 8$ e $\alpha\beta 6$ sono richieste per l'ingresso, in quanto la loro deplezione, risulta nel blocco dell'infezione del virus. gD, tuttavia, è il fattore chiave per l'ingresso delle cellule, perché il suo legame con uno dei suoi tre recettori alternativi attiva le glicoproteine a valle gH /gL e gB, che eseguono la fusione (11).

1.3.1 La glicoproteina gD: struttura e funzione

Il gene γ , US6, codifica per la glicoproteina D. La glicoproteina D agisce da proteina recettoriale d'ingresso ed è la principale determinante del tropismo virale (46). E' una proteina essenziale per l'ingresso di HSV-1 nelle cellule, il suo legame con uno dei suoi recettori alternativi attiva le glicoproteine a valle gH/gL e gB, che eseguono la fusione.

La struttura cristallografica di gD è stata risolta fino all'aa 259 per la proteina non legata, legata all'HVEM (fino all'aa 285 di gD) o alla nectina1 (fino all'aa 285 di gD) (47-49). gD è una glicoproteina di membrana di tipo 1. A seguito della maturazione, in cui la sequenza segnale di 25 aa all'N-terminale viene rimossa dalle proteasi, gD presenta una lunghezza di 369 aa. La sua struttura è costituita da un ectodominio di 316 aa, un dominio transmembrana situato tra gli aa 317 e 339 e una coda citoplasmatica di 30 aa .

Il suo ectodominio è organizzato in tre regioni con caratteristiche strutturali e funzionali differenti: la regione N-terminale, la regione centrale e quella C-terminale (Fig. 1.7) (47).

I primi 20 aa all’N-terminale della proteina matura sono disordinati, flessibili ed estesi quando la gD non è legata, mentre si trovano ripiegati a formare una forcina quando la gD si lega all’HVEM. Questa regione, che contiene i residui coinvolti nel legame del recettore HVEM (aa 1-32), si ripiega sulla porzione centrale della proteina alla quale è collegata attraverso una breve regione flessibile ricca di proline. I primi 32 aminoacidi sono anche coinvolti nel legame al 3-OS-HS, ma sono dispensabili per il legame alla nectina1 (49, 50).

La porzione centrale comprende una regione variabile dell’immunoglobulina (IgV) (dall’aa 56 al 184) e un’elica (α -elica 3) di 17 aa che termina all’aa 240. A valle dell’ α -elica 3 vi è una regione lunga e flessibile ricca in proline, che comprende gli aa 244-312. Dagli studi presentati da Zhou e Roizman (46) gli aminoacidi 61-218, che comprendono quasi interamente il nucleo IgV, non svolgono una funzione necessaria per l’ingresso HSV-1 nelle cellule. Difatti, per il nucleo IgV è stato proposto un ruolo strutturale, che fa da collegamento tra le regioni funzionali C- ed N-terminali. Questa ipotesi è stata confermata dall’evidenza che la rimozione del nucleo IgV e la sua sostituzione con un ligando eterologo quale un scFv diretto contro il recettore HER2 non compromettono la funzionalità della proteina (51).

La porzione C-terminale del ectodominio (aa 250/260-310), comprende il dominio profusogenico (PFD), una regione essenziale per l’innescio della fusione e per l’interazione con le altre glicoproteine virali (52-54). Di fatti, il modello di attivazione di gD mediata da nectina1/HVEM prevede che nella gD non legata, il dominio C-terminale si ripieghi sulla regione N-terminale, determinando una regione chiusa auto-inibita. In seguito al legame con uno dei suoi recettori, questa interazione viene meno, gD adotta una conformazione aperta nella quale il dominio C-terminale, liberato dai vincoli di interazione, si allontana dalla regione N-terminale. Dal momento che questo dominio può interagire con l’eterodimero gH/gL, questa “apertura”, dettata dalla dislocazione del C-terminale, sembra essere parte del meccanismo che segnala il riconoscimento dei recettori alle glicoproteine a valle, responsabili dell’esecuzione della fusione (52, 55).

I residui di gD coinvolti nel legame con la nectina1, sono diversi da quelli interessati per l’HVEM e si trovano a valle del residuo 32. Diversamente della regione di legame all’HVEM, i residui che contattano nectina1 non sono definiti in una precisa regione. La recente struttura risolta del complesso gD/nectina1 ha indentificato la regione di contatto tra le due molecole e rivelato i residui chiave coinvolti nel legame con il recettore (Q27, Y38, D215, Q132, L220, R222, F223). La maggior parte dei residui identificati risiedono nella regione C-terminale dell’ectodominio di gD, mentre i residui Y38 e Q27 sono situati nella porzione N-terminale (49).

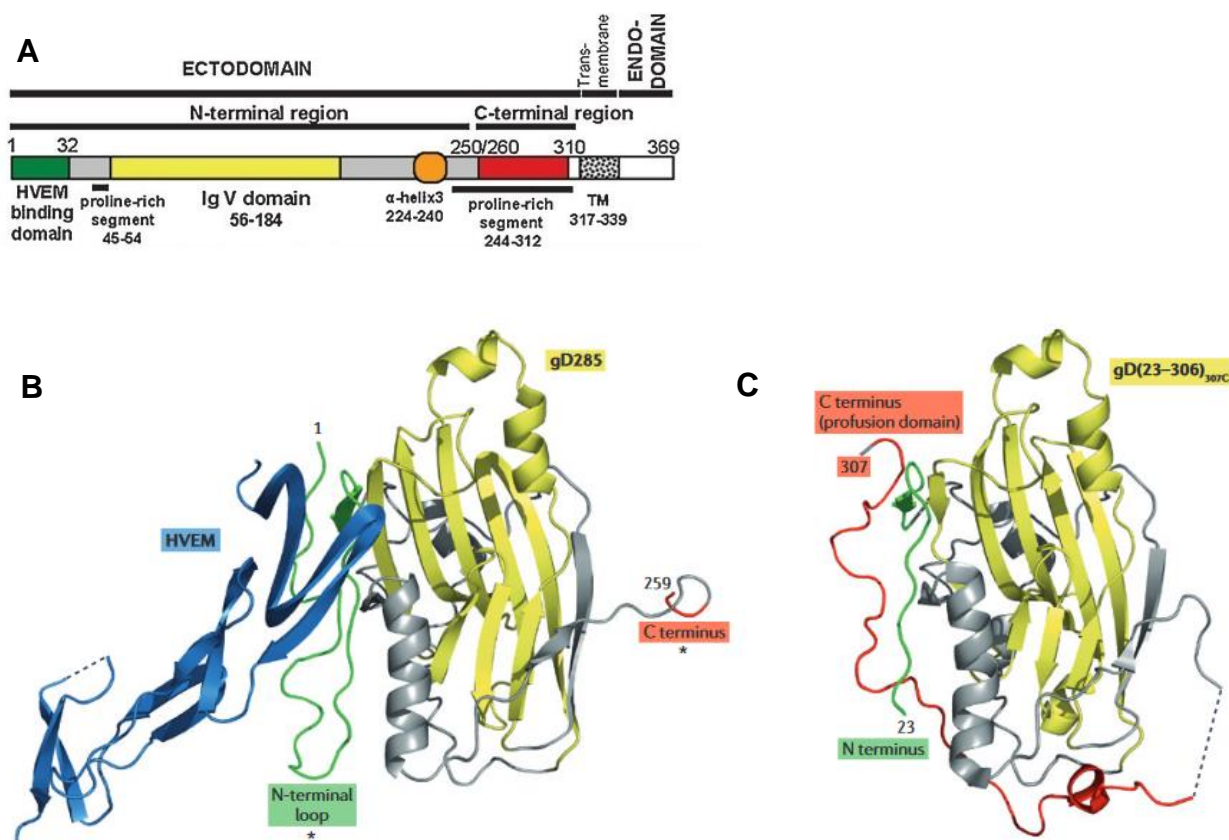


Fig. 1.7 - La struttura della glicoproteina gD di HSV-1. A) Rappresentazione schematica dei domini di gD di HSV-1. B) La glicoproteina D di HSV-1 legata all'HVEM (PDB ID 1JMA). Per cristallizzare il complesso gD/HVEM è stata utilizzata una forma tronca dell'ectodominio di gD (gD285) con elevata affinità per l'HVEM. Gli asterischi indicano le differenze conformazionali che si osservano nella gD285 in presenza o in assenza del suo recettore. In presenza di HVEM, l'N terminale di gD285 (verde) forma un *loop* che serve da sito recettoriale ed è stabilizzato dal legame col recettore. La regione C-terminale, che comprende i residui 260-285, è disordinata nel cristallo. C) gD non legata da recettore (PDB ID 2C3A). La porzione centrale di gD si ripiega a formare un *folding* immunoglobulinico (giallo), fiancheggiato dalle estensioni N-(verde) e C-terminali (rosso). In assenza di HVEM, la regione C-terminale, che include il dominio profusogenico, è ancorata vicino alla regione N-terminale. Il C-terminale maschera il sito di legame col recettore e il *loop* N-terminale non è presente (48, 53).

1.3.2 Il complesso delle glicoproteine gH/gL: struttura e funzione

I geni γ , UL22 e UL1, codificano rispettivamente per la glicoproteina H (gH) e per la glicoproteina L (gL). gH è una glicoproteina di membrana di tipo I di 838 aa contenente un peptide segnale di 18 aa, un ectodominio esteso di 785 aa, un singolo dominio transmembrana idrofobico di 21 aa in prossimità del C-terminale e una coda citoplasmatica C-terminale di 14 aa. gL è una proteina di 224 aa con un peptide segnale di 25 aa, ma non contiene un dominio transmembrana, poiché è associata alla membrana e incorporata nelle particelle virali grazie all'interazione con gH (56); gH e gL formano un complesso stabile con stechiometria 1:1.

La struttura cristallina del complesso gH/gL di HSV-2 è stata risolta (Fig. 1.8): il complesso ha

una forma a stivale e si compone di tre domini (42). Il dominio H1 (residui 49-327) di gH, che si trova nella parte superiore dello stivale, forma il sito di contatto con gL. E' diviso a sua volta in due sottodomini (H1A e H1B) collegati tra loro da un corto linker. Il dominio centrale H2 (residui 332-644) è globulare e costituito principalmente da alfa eliche. Il dominio C-terminale H3 (residui 645-797) si trova all'estremità dello stivale ed è un β -sandwich. gL non presenta una conformazione regolare, infatti solo il 30% della proteina ha una struttura secondaria, che comprende tre eliche e due foglietti beta; inoltre gL contiene due legami disolfuro essenziali per il ripiegamento e la funzione del complesso.

Nelle cellule trasfettate, in assenza di gL, il polipeptide gH non è né ripiegato né processato correttamente, ma rimane nel reticolo endoplasmatico e va incontro ad auto-aggregazione (57, 58). In modo analogo, cellule infettate con un virus gL-nullo non producono virioni contenenti gH. L'eterodimero gH/gL è altamente conservato all'interno della famiglia *Herpesviridae*, è essenziale per un efficiente ingresso e fusione cellulare del virus, la sua delezione produce infatti una progenie non infettiva e abolisce la fusione cellula-cellula (59); i virioni deleti nella gH tuttavia sono ancora in grado di legarsi alla superficie cellulare. Numerosi anticorpi neutralizzanti diretti verso gH sono stati isolati e il loro utilizzo blocca l'ingresso del virus ma non il legame alla superficie della cellula ospite (60).

Anche se gL è necessaria per il corretto ripiegamento e trasporto di gH, non può essere considerata una vera e propria proteina *chaperon*, perché rimane associata a gH anche dopo la sua maturazione. Sembra piuttosto che l'interazione di gH con gL stabilizzi la loro conformazione.

Prima che il cristallo di gH/gL fosse risolto, era stato proposto per l'eterodimero il ruolo di fusogeno, poiché contiene elementi strutturali tipici delle proteine di fusione, in particolare un' α -elica idrofobica (residui 377-397) con proprietà tipiche di un peptide di fusione e due *heptad repeats* (motivo strutturale che consiste nella ripetizione di sette aa) con la propensione a formare un *coiled coil* (motivo strutturale in cui 2-7 α -eliche sono avvolte tra di loro). Tuttavia la struttura cristallina dell'eterodimero gH/gL di HSV-2 non presenta analogie con nessun fusogeno virale conosciuto; inoltre i putativi peptidi di fusione sono eliche o forcine beta sepolte all'interno della struttura e partecipano alla formazione di foglietti β , per cui una loro rimozione in seguito a spostamento inciderebbe negativamente sulla stabilità del complesso. Per queste ragioni, gB è stata indicata come la vera proteina fusogena e il complesso gH/gL agirebbe da regolatore positivo nel passaggio di gB alla sua forma attiva per la fusione (42). Diversi studi sono stati condotti per individuare i possibili recettori del complesso gH/gL. I lavori di Gianni et al. (43) hanno dimostrato che le integrine $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$ sono recettori del complesso gH/gL e svolgono un ruolo critico nell'ingresso di HSV in diverse linee cellulari epiteliali, quali i cheratinociti e i

neuroni. Ciascuna delle due integrine agisce per promuovere l'entrata di HSV indipendentemente dall'altra e la loro funzione è intercambiabile. Il silenziamento simultaneo delle integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$ in cellule epiteliali riduce l'infezione di circa il 90% e conferma il loro ruolo cruciale nell'infezione da HSV (43).

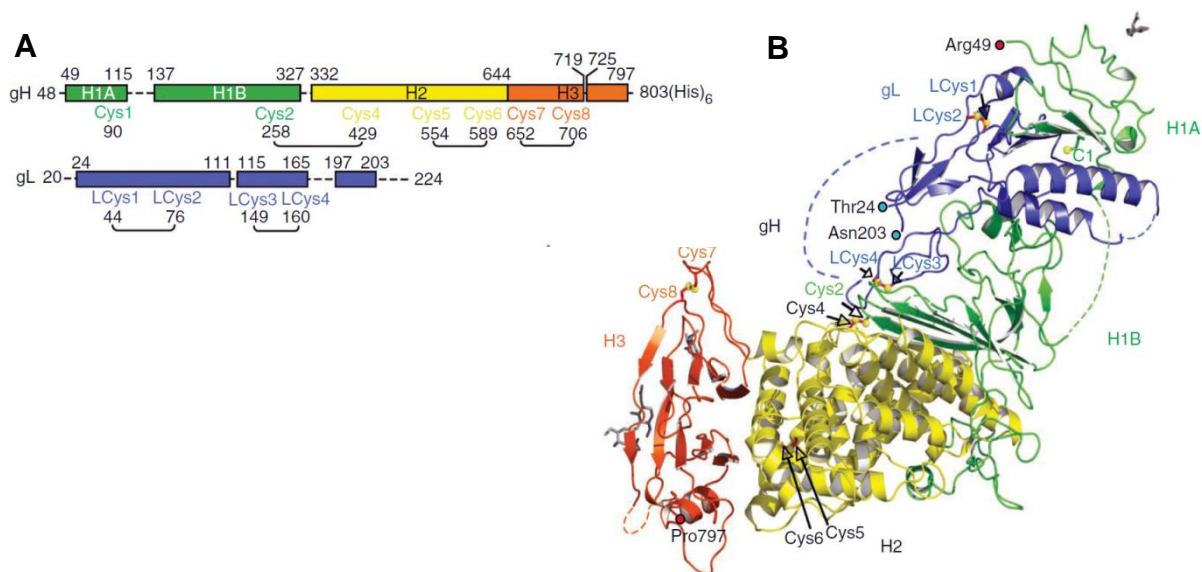


Fig. 1.8 - La struttura del complesso gH/gL di HSV-2. A) Rappresentazione schematica dei domini di gH e gL di HSV-2; le linee tratteggiate rappresentano strutture non risolte, i domini di gH sono in verde (H1), giallo (H2) e rosso (H3). gL è rappresentata in blu. B) L'ectodominio del complesso gH/gL di HSV-2 (PDB ID 3M1C). L'eterodimero gH/gL adotta una conformazione a stivale, e il dominio amino-terminale H1 di gH, che comprende i sottodomini H1A e H1B, stabilisce estesi contatti con gL. I domini C-terminali di gH, H2 e H3 sono mostrati in giallo e rosso, rispettivamente. Sono raffigurati i segmenti disordinati (come linee tratteggiate), gli zuccheri (in grigio), cisteine e ponti disolfuro (sfere di colore giallo e bastoni rossi) (42).

1.3.3 La glicoproteina B: struttura e funzione

Il gene γ , UL27, codifica per la glicoproteina B (gB), la proteina fusogenica di HSV-1, altamente conservata all'interno della famiglia degli herpesvirus. gB è una delle glicoproteine essenziali nell'ingresso di HSV ed è coinvolta sia nell'attacco del virus alla superficie cellulare, attraverso l'interazione con l'eparan solfato, che nella fusione con le membrane cellulari in un processo che richiede anche gH e gL (61).

gB di HSV-1 è una glicoproteina di membrana di tipo I di 904 aa, costituita da una sequenza segnale N-terminale di 30 aa, da un esteso ectodominio di 696 aa, da un dominio transmembrana di 69 aa e da una coda citoplasmatica di 109 aa (45). La struttura cristallografica di gB di HSV-1 nella forma post-fusione è stata risolta per gli aa 103-730 appartenenti all'ectodominio (Fig. 1.9) (45), mentre la struttura a bassa risoluzione della forma intera pre-fusogenica è stata recentemente ottenuta da studi di crio-tomografia elettronica (62). Il cristallo dell'ectodominio di

gB ha rivelato una stretta omologia con la struttura della glicoproteina fusogenica G del VSV, fornendo un'ulteriore conferma del ruolo di esecutore della fusione nell'infezione di gB e classificandola come proteine di fusione di classe III (63).

L'ectodominio di gB forma un trimero e ciascun protomero è composto da 5 domini. Il dominio I (dominio di fusione) (aa 154-363) forma un'estesa struttura a foglietto β alla base del trimero e comprende due *loop* che verosimilmente formano il peptide di fusione bipartitico, caratteristico delle proteine di fusione di classe III. Il dominio I ha una struttura terziaria caratteristica del dominio PH (*pleckstrin homology*), tipico di proteine coinvolte nel *signaling* intracellulare, quale ad esempio la proteina chinasi C. Questo dominio può legare sia derivati dei fosfatidilinositoli presenti nelle membrane biologiche che altri domini proteici. Attraverso queste interazioni il dominio PH svolge un ruolo chiave nel reclutare le proteine alle membrane, indirizzandole al compartimento cellulare appropriato.

Anche il dominio II (aa 142-153 e 364-459) è caratterizzato da un barile β a ripiegamento PH. È stato ipotizzato che i moduli PH del dominio I e II fungano da siti di legame per proteine coinvolte nella fusione e nell'ingresso (64). Il segno distintivo del dominio III (aa 117-133, 500-572 e 661-669) è la lunga α -elica centrale che forma un avvolgimento con le altre due eliche dei due protomeri, formando i contatti necessari alla trimerizzazione. Il dominio IV (aa 11-116 e 573-660) che non ha analogie strutturali con proteine descritte in precedenza, è il dominio più distale dalla membrana virale e presenta numerosi siti di legame per anticorpi neutralizzanti. Un lungo segmento proteico non strutturato forma il dominio V (aa 670-725), che non ha contatti con il resto della catena polipeptidica dello stesso protomero, ma piuttosto si inserisce tra gli altri due protomeri, rafforzando le interazioni del trimero.

Il dominio citoplasmatico (CTD) (aa 796-904), assente nel cristallo, sembra regoli negativamente la fusione. Sebbene l'infezione da HSV-1, tipicamente, non causi fusione cellulare, isolati clinici di HSV-1 con delezioni, mutazioni puntiformi, o inserzioni nel CTD inducono la formazione di cellule multinucleate chiamate sincizi (65). Un'altra regione che non è stato possibile cristallizzare finora è la regione N-terminale che comprende i residui 31-110, dopo il taglio della sequenza segnale di 30 aa. La regione N-terminale, ed in particolare i residui 68-76 sono responsabili dell'interazione di gB con l'eparan solfato (37). Studi di bioinformatica che hanno confrontato diversi ceppi di HSV-1, hanno dimostrato che metà delle variazioni nella gB mappano nei primi 80 residui, indicando che questa regione è la meno conservata (66). Inoltre numerosi anticorpi neutralizzanti mappano in questa regione, sottolineando la sua importanza nella risposta immunitaria (67).

Come anticipato in precedenza, gB, insieme a gC partecipa al primo attacco del virione alla cellula, attraverso l'interazione con l'eparan solfato. Questa interazione è tuttavia dispensabile

per l'infezione e forme solubili di gB legano cellule prive di eparan solfato (68). Da questa osservazione è nata la scoperta dei recettori di gB. Ad oggi, ne sono stati identificati tre: PILR α (*Paired immunoglobulin-like type 2*), MAG (glicoproteina associata alla mielina), NMHC-IIA e B (*non-muscle myosin heavy chain* IIA e B, isoforme IIA e B della catena pesante della miosina non muscolare). Il legame di gB con la molecola PILR α , espressa principalmente sulle cellule del sistema immunitario, sembra giocare un ruolo chiave nell'ingresso di HSV-1 nei monociti, un target tuttavia inusuale per il virus *in vivo* (69). L'interazione di PILR α con gB media l'infezione di HSV-1; anticorpi diretti contro PILR α hanno un'azione inibente sull'infezione nei monociti, ma la sola interazione gB-PILR α , in assenza del legame gD-HVEM non è sufficiente per mediare la fusione cellulare. La glicoproteina associata alla mielina (MAG) è una proteina di superficie specificatamente espressa sulle cellule della glia, come gli oligodendrociti e le cellule di Schwann ma non su cellule epiteliali e neuroni, i target di HSV-1 *in vivo*. Suenaga e colleghi (70) hanno dimostrato che MAG si associa a gB di HSV-1, ne aumenta l'infezione nei promielociti e promuove la fusione cellulare in cellule epiteliali, se co-espressa con gD e il complesso gH/gL.

Le isoforme IIA e B della catena pesante della miosina non muscolare, sono due isoforme di una subunità della miosina non-muscolare II, un motore molecolare ATP-dipendente presente in diversi tipi di cellule e tessuti. NMHC-IIA e B possono interagire con la gB di HSV-1 e fungere da recettori per l'ingresso del virus; di fatti una loro over-espressione in cellule resistenti ad HSV-1 le rende suscettibili al virus. Viceversa, un knockdown delle due isoforme in cellule permissive inibisce l'ingresso di HSV-1 e la fusione cellulare *in vitro* (71, 72).

Il limitato contributo di questi recettori di gB al tropismo virale nel suo complesso è evidenziato dall'osservazione che eliminando l'interazione di gD con i suoi recettori viene abolito anche l'ingresso del virus in praticamente qualsiasi cellula. Per cui le molecole sopra descritte fungono principalmente da co-recettori, più che da recettori cellulari che determinano il tropismo di HSV-1, come nel caso della nectina1 e HVEM.

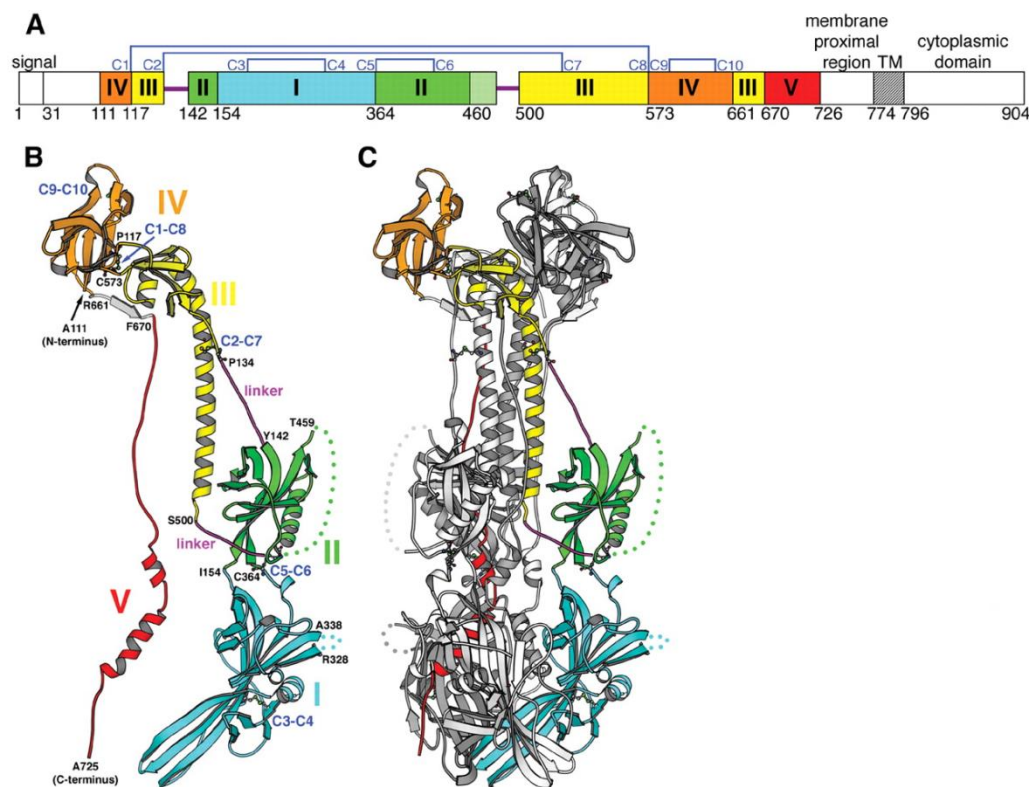


Fig. 1.9 - La struttura della glicoproteina gB di HSV-1. A) Rappresentazione schematica dei domini di gB di HSV-1. B) Struttura terziaria del singolo protomero di gB. Il dominio I (in ciano) che forma la base del protomero presenta un ripiegamento PH e porta alla sua punta i due *loop* di fusione. I moduli PH del dominio I (in ciano) e del dominio II (in verde) verosimilmente servono da siti di legame per proteine coinvolte nella fusione e nell'ingresso di HSV-1. Il dominio centrale III (in giallo) contribuisce principalmente a fornire i siti di contatto tra i tre protomeri, mediante la formazione di un *coiled coil* (dominio formato da α eliche superavvolte) tra le singole α -eliche centrali. Il dominio IV (in arancione), distale dalla membrana virale porta numerosi siti di legame per anticorpi neutralizzanti. Il dominio V (in rosso) si inserisce nel solco formato dagli altri due protomeri, rafforzando in questo modo la stabilità del complesso. C) Il trimero di gB. Il primo protomero ha i colori del pannello A, il secondo è raffigurato in bianco mentre il terzo è rappresentato in grigio (45).

1.3.4 La glicoproteina C: struttura e funzione

La glicoproteina C (gC) è codificata dal gene γ UL44 (73). Si tratta di una glicoproteina di 511 aa caratterizzata da un elevato numero di N- e O-glicosilazioni. gC contiene una sequenza segnale di 25 aa all'N terminale, un dominio extracellulare di 453 aa, un dominio di ancoraggio transmembrana di 23 aa e una corta coda citoplasmatica di 10 aa al C terminale. Come sopra anticipato, gC media il primo contatto del virus con la cellula, attraverso il legame ai residui di eparan solfato e condroitin solfato presenti sui proteoglicani della membrana (41). Sebbene gC sia indispensabile per l'infezione di cellule in coltura, la sua presenza può aumentare l'efficienza del legame del virus di circa 10 volte, almeno per HSV-1. La sua funzione principale, quindi, sembra essere quella di concentrare il virus sulla superficie cellulare, permettendo una

interazione più stabile di gD con un recettore di ingresso. gC presenta delle sporgenze lunghe e sottili, che sono le strutture più esternamente esposte del virione. Il ruolo di gC è confermato dal fatto che gli anticorpi monoclonali diretti contro gB, gD e gH inibiscono la penetrazione di HSV-1 ma hanno poco o nessun effetto sull'attacco del virus alla cellula. Altra caratteristica di gC è la sua capacità di legare la componente C3b del complemento e, nel contesto della risposta immunitaria, gli antigeni di gC provocano una forte risposta immunitaria sia umorale che cellulare (74).

1.4 Virus oncolitici

I virus oncolitici sono virus vivi, che si replicano selettivamente nelle cellule tumorali e ne causano la lisi. La viroterapia oncolitica offre diversi vantaggi rispetto alle terapie convenzionali (75, 76). i) In primo luogo, è possibile uccidere selettivamente le cellule neoplastiche mitoticamente attive attraverso l'ingegnerizzazione genetica dei virus. ii) In secondo luogo, si può fare uso di virus competenti per la replicazione per ottenere una propagazione dell'infezione alle cellule tumorali distali dal sito di iniezione. In questo modo la lisi delle cellule tumorali non è confinata al sito di inoculo e al *pool* di cellule inizialmente infette. iii) In aggiunta alla lisi diretta delle cellule tumorali come conseguenza dell'infezione, (che porta anche all'amplificazione del numero di copie virali all'interno del tumore), molti vettori oncolitici inducono una potente risposta immunitaria all'interno del tumore, che è notoriamente un microambiente immunosoppressivo. iv) Alcuni virus possono essere potenziati, attraverso l'introduzione di geni eterologhi, come ad esempio molecole immunostimolatori quali la citochina IL-12. v) La viroterapia oncolitica inoltre può essere combinata con la terapia clinica standard. vi) Infine, il meccanismo attraverso il quale il virus elimina le cellule tumorali coinvolge numerosi pathway cellulari, rendendo l'insorgenza di meccanismi di resistenza al trattamento poco probabili.

La viroterapia non è un concetto nuovo. L'idea di utilizzare un virus come agente oncolitico risale all'inizio del XX secolo e si basa sull'osservazione della regressione spontanea di tumori in pazienti vaccinati contro la rabbia o in concomitanza ad infezioni virali (77). Di fatto, la maggior parte dei virus può replicare in misura molto maggiore nelle cellule tumorali rispetto a cellule sane. Questo è dovuto alla presenza, nelle cellule tumorali, di mutazioni nella risposta immunitaria anti-virale, quale ad esempio la via di segnalazione dell'interferone. Pertanto, il problema principale non è quello di ottenere un virus in grado di replicarsi nelle cellule tumorali. Quello che risulta difficile è rendere un virus incapace di replicare in cellule normali, mantenendo la sua specificità per le cellule tumorali.

Fino ad oggi, due virus oncolitici geneticamente modificati sono stati approvati per l'uso in clinica. Il primo è Oncorine (H101), un adenovirus approvato nel 2005 in Cina per il trattamento del cancro della testa e del collo e del cancro all'esofago (78, 79). La selettività per le cellule cancerose è stata ottenuta eliminando il meccanismo di difesa antivirale, in particolare mediante la delezione del gene E1B, il cui prodotto interagisce con il gene umano p53, spesso deregolato nelle cellule tumorali. L'uso dell'H101 è tuttora confinato alla Cina.

Il secondo virus approvato per l'uso in clinica è il T-Vec (talimogene laherparepvec, IMLYGIC, già OncoVEX GM-CSF), che è stato approvato nel 2015 negli USA e nel 2016 in Europa per il trattamento del melanoma in stadio avanzato (4). Il T-Vec è un HSV-1 che presenta la delezione di entrambe le copie del gene $\gamma 34.5$ e del gene $\alpha 47$, e l'inserzione del gene umano che codifica per il GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi) nei locus deleti di $\gamma 34.5$ (80). La delezione dei geni $\gamma 34.5$ è principalmente responsabile della replicazione selettiva nelle cellule tumorali e per l'attenuazione della patogenicità (24, 81). Dato che la funzione del gene $\gamma 34.5$ è quella di impedire l'arresto della sintesi proteica innescato dall'infezione virale, l'inattivazione del gene $\gamma 34.5$ rende il virus incapace di replicare nelle cellule normali. Tuttavia, poiché le cellule tumorali presentano difetti nella risposta di arresto della sintesi proteica, virus HSV-1 deleti del gene $\gamma 34.5$ possono ancora replicare nelle cellule tumorali (82). La funzione del gene $\alpha 47$ è quella di down-regolare l'espressione del complesso MHC I coinvolto nella presentazione degli antigeni, per cui la delezione di questo gene aumenta la risposta immunitaria antitumorale. La delezione del gene $\alpha 47$ facilita inoltre l'espressione precoce del gene U_S11. U_S11 blocca la fosforilazione intracellulare della chinasi RNA-dipendente (in inglese PKR), un enzima che in risposta al *signaling* dell'IFN porta all'inibizione della sintesi proteica. Una espressione precoce di U_S11, quindi, risulta in un incremento della replicazione nelle cellule infette. La modificazione finale del HSV-1 è stata l'inserzione del GM-CSF, una citochina infiammatoria che dovrebbe stimolare il micro-ambiente immunosoppressivo tumorale e potenzialmente stimolare un effetto anti-tumorale sistemico. GM-CSF svolge numerose funzioni, incluso il reclutamento dei monociti dal sangue periferico e l'attivazione di monociti e cellule dendritiche per la presentazione dell'antigene alle cellule T, un evento iniziale critico nella risposta immunitaria anti-tumorale (83).

I virus oncolitici più promettenti i cui trial clinici sono in fasi più avanzate sono elencati nella Tabella 2 nella quale sono riportate anche le modificazioni genetiche a carico del genoma virale. Virus ricombinanti a DNA presenti nei trial clinici includono adenovirus, herpesvirus e il virus del vaccino, mentre per i virus a RNA è presente un reovirus (84).

Tabella 2 - I principali virus oncolitici utilizzati nei trial clinici (84).

	Virus	Gene modification	Gene insertion	Target disease	Company	Status
T-Vec (Imlygic, talimogene laherparepvec)	HSV-1	γ 34.5, α 47	Human GM-CSF	Unresected stage IIIB to IV melanoma	Amgen	The drug is approved in the USA in 2015 and in Europe in 2016
G47 Δ	HSV-1	γ 34.5, ICP6, α 47	lacZ	Glioblastoma	Investigator-initiated	A phase II study started in 2015. It was designated as Sakigake breakthrough therapy by MHLW of Japan
JX-594 (Pexa-vec, pexastimogene devacirepvec)	Vaccinia virus	Thymidine kinase	Human GM-CSF, lacZ	Advanced stage hepatocellular carcinoma	Sillajen	A phase III started in 2015
CG0070	Adenovirus	E2F-1 promoter / E1A gene	Human GM-CSF	Non-muscle invasive bladder cancer after BCG failure	Cold Genesys	A phase II/III randomized controlled trial is ongoing in patients with bladder cancer
Reolysin (pelareorep)	Reovirus	None		Metastatic and/or recurrent head and neck cancer	Oncolytics Biotech	A phase III is completed. It received an orphan drug designation from FDA

Alcuni tipi di virus presentano un naturale tropismo per le cellule tumorali e vengono utilizzati nella loro forma *wt*, come ad esempio il Reovirus e il *New Castle Disease virus* (NDV). La maggior parte dei virus oncolitici, invece, viene geneticamente modificata per aumentarne la specificità verso i tumori, limitando l'infezione ai tessuti sani.

I virus possono essere riprogrammati in vettori oncolitici combinando diverse strategie: controllo della trascrizione e replicazione, reindirizzamento del tropismo, potenziamento e schermatura, (76). In particolare, la trascrizione e la replicazione virale possono essere rese tumore-specifiche. Il reindirizzamento del tropismo verso cellule tumorali introduce una maggiore specificità per il tumore e migliora la sicurezza e l'efficacia del virus; il potenziamento si ottiene attraverso l'espressione di profarmaci e citochine con attività antitumorale; il rivestimento con polimeri e l'uso di diversi capsidi o pericapsidi fornisce protezione al virus dalla risposta immunitaria dell'ospite.

Nei successivi paragrafi verranno descritte le varie strategie perseguite per riprogrammare un virus *wt* in un agente oncolitico, e particolare attenzione sarà rivolta alle strategie di reindirizzamento tramite modifiche dell'apparato d'ingresso del virus HSV-1, oggetto di studio di questa tesi.

1.4.1 Controllo della trascrizione e replicazione virale

La trascrizione e la replicazione virale possono essere rese tumore-specifiche. Per quanto riguarda la trascrizione, i prodotti genici virali essenziali possono essere posti sotto il controllo di specifici promotori tumorali. Virus a DNA, quali herpesvirus e poxvirus, sono i candidati più adatti a questo tipo di approccio perché possono tollerare inserzioni di ampi elementi regolatori

nel loro genoma (76). Negli adenovirus, ad esempio, il prodotto del gene E1A che normalmente transattiva i promotori virali per iniziare il ciclo di replicazione, è stato posto sotto il promotore dell'antigene specifico di membrana della prostata (PSMA) per ottenere la specificità tumorale (85). Altri adenovirus sono stati progettati per essere controllati trascrizionalmente dal promotore *survivin*, attivo solo nelle cellule tumorali (86). Tuttavia, una limitazione all'uso di questi promotori è rappresentata dalla probabilità che all'interno del tumore il promotore non sia attivo in tutta la popolazione cellulare e che quindi non tutte le cellule vengano infettate a seguito della somministrazione del virus oncolitico.

Un altro livello di specificità per le cellule tumorali, può essere ottenuto a livello della replicazione virale. Vengono sfruttati alcuni difetti specifici delle cellule tumorali al fine di ridurre la tossicità virale nel tessuto sano. Molti o-HSV sono stati ingegnerizzati eliminando il gene responsabile della neurovirulenza (γ 34.5) o i geni legati al metabolismo degli acidi nucleici (ad es ICP6, la subunità della nucleotide riduttasi) al fine di ottenere virus in grado di replicare solo nelle cellule tumorali in attiva replicazione (87, 88). Vettori oncolitici derivanti da adenovirus sono resi selettivi per i tumori mediante delezioni o mutazioni nei geni precoci E1 (E1A o E1B) (89). I prodotti di tali geni bloccano i fattori cellulari pRb e p53 responsabili, rispettivamente, dell'attivazione del ciclo cellulare e del blocco dell'apoptosi, processi frequentemente alterati nelle cellule tumorali. Gli agenti oncolitici adenovirali deleti in questi geni si replicheranno preferenzialmente nei tumori rispetto ai tessuti sani. Fa parte di questa tipologia di vettore il già menzionato H101, un adenovirus deleto in E1B-55k approvato nel 2005 in Cina per il trattamento del cancro della testa e del collo e del cancro all'esofago (78).

I virus così ingegnerizzati sono detti anche attenuati, con riferimento ad una minore o assente replicazione e quindi minore tossicità per le cellule sane. Tuttavia, è emerso chiaramente che abolendo completamente l'espressione di alcune proteine virali si attenua la replicazione virale, anche in cellule tumorali, poiché queste proteine virali spesso hanno funzioni multiple. Pertanto, le attuali strategie di attenuazione si stanno muovendo verso modifiche quanto più conservative possibili delle proteine virali, come ad esempio attraverso la mutazione di singoli residui che sono essenziali per interazioni specifiche (76). Un altro limite di questa strategia è che la replicazione virale è strettamente dipendente dai difetti intrinseci nel tumore e non prende in considerazione l'elevata eterogeneità all'interno della massa tumorale.

1.4.2 Reindirizzamento del tropismo virale

Per superare i limiti imposti dall'attenuazione, una strategia alternativa è quella del cosiddetto reindirizzamento recettoriale, che si propone di alterare lo spettro d'ospite del virus, modificando le proteine virali coinvolte nel riconoscimento della superficie cellulare, senza però

compromettere l'abilità del virus di penetrare nella cellula (90, 91). Questa tipologia di reindirizzamento comporta l'abrogazione del tropismo naturale del virus e l'acquisizione di quello tumorale, rendendo il virus tumore specifico. In teoria, questa strategia offre il vantaggio di poter somministrare virus molto virulenti e/o a dosaggi maggiori, poiché questi agenti terapeutici sono capaci di infettare solo cellule tumorali diminuendo la tossicità della viroterapia. L'eliminazione del tropismo naturale può essere conseguita tramite mutagenesi di proteine virali di superficie in residui noti per essere responsabili del legame con il recettore cellulare naturale. Per ottenere invece la specificità cellulare (tumorale) si può inserire, nelle proteine virali di superficie che mediano l'ingresso del virus, un anticorpo diretto contro un recettore sovra espresso sulle cellule tumorali. Esempi di recettori sovra espressi nei tumori sono l'antigene carcino-embrionale (CEA), il recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGFR), il recettore del fattore di crescita dell'epidermide 2 (HER2) o il cluster di differenziazione 20 (CD-20) (92). Data la struttura complessa e la dimensione degli anticorpi, per ovviare alla difficoltà di ingegnerizzazione di proteine chimeriche virali, negli ultimi decenni si è ricorso all'uso dei scFv, ossia il frammento anticorpale variabile a catena singola, che consiste nelle regioni variabili della catena pesante e leggera per cui, in dimensioni ridotte, mantiene completa la specificità antigenica verso il recettore tumorale.

L'idea che è oramai emersa è che il reindirizzamento recettoriale sia facilmente realizzabile con virus dotati di *envelope*, probabilmente perché la struttura delle glicoproteine dell'*envelope* impone meno vincoli strutturali rispetto alla struttura rigida delle proteine del capsido. Di fatti, i migliori risultati sono stati ottenuti finora con virus rivestiti di *envelope* che codificano per due glicoproteine distinte per l'attacco e per la fusione, esemplificati dal virus dell'HSV e dal morbillo (91, 93). Un virus del morbillo, completamente reindirizzato al recettore EGFR o al CD38, è stato ottenuto inserendo un scFv specifico per queste molecole nell'emoagglutina mutata in residui chiave per l'interazione con i recettori naturali, la molecola di segnalazione dei linfociti attivati SLAMF7 e CD46 (93). Per quanto riguarda HSV-1, sono stati ingegnerizzati diversi vettori virali reindirizzati a recettori tumorali tramite l'inserzione di anticorpi o scFv principalmente nella glicoproteina D deletta dei residui coinvolti nel legame coi suoi recettori naturali, nectina1 e HVEM (51, 94). Il re-indirizzamento di HSV-1 sarà trattato in dettaglio nel capitolo successivo, dedicato agli herpesvirus oncolitici.

1.4.3 Potenzamento

Ad oggi, un certo numero di virus oncolitici sono entrati nei trial clinici. I dati che sono emersi dalla sperimentazione clinica hanno dimostrato che questi agenti sono sicuri, ma non abbastanza efficaci, utilizzati come monoterapia, da ottenere una regressione completa del tumore o per

generare una risposta clinica duratura. Una delle strategie che si sta portando avanti per potenziare l'effetto terapeutico dei vettori virali è quella di armare/potenziare i virus con geni terapeutici, sfruttando meccanismi citotossici addizionali, che vanno oltre la lisi diretta da parte del virus. Particolarmente interessanti in questo contesto sono quei meccanismi citotossici che presentano un effetto *bystander* in grado di eliminare le cellule tumorali che il virus non può raggiungere direttamente. Il potenziamento si può ottenere con varie modalità: tramite l'inserzione nel *backbone* del virus di i) un transgene che converte un profarmaco in un prodotto tossico per la cellula ii) una molecola immunomodulatoria capace di stimolare la risposta immune iii) un transgene pro-apoptotico che induce la morte programmata della cellula ad uno stadio tardivo dell'infezione (75, 76).

Per quanto riguarda le terapie a base di profarmaci, i transgeni più utilizzati sono la timidina chinasi (TK) di HSV e la citosina deaminasi (CD), in combinazione coi rispettivi profarmaci ganciclovir (GCV) e 5-fluorocitosina (5-FC) che vengono convertiti in prodotti tossici all'interno del tumore. (95, 96).

L'evasione immune, riconosciuta come uno dei segni distintivi del tumore, rappresenta un bersaglio importante per la nuova terapia del cancro. I tumori producono citochine immunosoppressive (ad esempio, il TGF β) e reclutano cellule con funzione inibitoria del sistema immunitario (ad esempio, i T-reg), paralizzando in questo modo la risposta immunitaria contro il tumore (97). La morte cellulare indotta dai virus oncolitici è di per se immunogenica e porta ad una risposta infiammatoria localizzata, che tuttavia non sembra essere sufficiente. Una vasta gamma di geni immunostimolatori perciò, è stata inseriti nel genoma dei virus oncolitici con lo scopo di stimolare risposte immunitarie, sempre più efficaci. Esempi includono le proteine da shock termico HSP70, la chemochina (CCL5), l'IFN α e β , il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF), l'interleuchina 12, l'interleuchina 18 e l'IL-24 (98). L'importanza dell'induzione di una concomitante risposta immunitaria nella terapia oncolitica è stata confermata dall'approvazione per l'uso clinico del T-Vec in USA e in Europa. T-Vec è un HSV-1 modificato per secernere il GM-CSF, una citochina infiammatoria che agisce da chemoattraente per diversi tipi di cellule del sistema immunitario (4).

Un'apoptosi indotta ad uno stadio tardivo dell'infezione virale, quando la progenie virale è matura, può migliorare il rilascio del virus dalle cellule infette e aumentarne la diffusione e l'effetto antitumorale. Esempio di un transgene pro-apoptotico è il ligando inducente l'apoptosi relativo al TNF (TRAIL). Adenovirus ingegnerizzati per esprimere il TRAIL sono più oncolitici rispetto ai virus parentali in diversi modelli tumorali sia *in vitro* che *in vivo* (99, 100).

1.4.4 Schermatura

Uno dei problemi ancora aperti nel campo della viroterapia oncolitica è l'utilizzo della via di somministrazione sistemica per il trattamento delle metastasi tumorali. Poiché molti virus oncolitici sono derivati da virus umani, la presenza di una immunità preesistente nei pazienti (*prior immunity*) può rapidamente inattivare il virus a seguito dell'iniezione del trattamento.

Una strategia per limitare l'effetto degli anticorpi neutralizzanti è quello di sfruttare gli effetti collaterali immunosoppressivi dei chemioterapici come la ciclofosfamide (CPA). Il CPA è un profarmaco che viene attivato nel fegato in un potente agente DNA-alchilante. Oltre al suo uso come chemioterapico per alcuni tipi di cancro, il CPA ha anche un'azione immunosoppressiva e pertanto è stato utilizzato in combinazione con diversi virus per facilitarne la diffusione (101, 102).

Un secondo approccio è quello di rivestire chimicamente i virus con polimeri, come ad esempio il glicole polietilenico (PEG). Questo polimero idrofilico può essere cross-linkato ai virus per proteggerli da una risposta anticorpale pre-esistente e ridurre la nuova risposta anticorpo- e T-cellulare mediata (103).

Un recente approccio per aggirare gli ostacoli dovuti ad una somministrazione sistemica prevede l'uso di cellule come vettori (*carrier*), che trasportano il virus al tumore. I primi studi facevano uso di cellule tumorali irradiate e non hanno avuto un futuro a causa di problemi legati alla sicurezza (104, 105). Le cellule staminali mesenchimali si presentano come un vettore promettente poiché si accumulano nello stroma del tumore per le condizioni di ipossia e per l'espressione di citochine infiammatorie (106). Recentemente Campadelli e colleghi hanno riportato che cellule mesenchimali stromali (MSC) provenienti da differenti fonti (placenta, tessuto adiposo, polpa dentale, midollo osseo) possono essere forzatamente infettate con un HSV oncolitico HER2-reindirizzato, esponendo la miscela virione-MSC all'agente fusogenico PEG 6000 (107). La progenie virale si propaga dalle MSC alle cellule tumorali sia *in vitro* che in modelli murini di tumori metastatici.

1.5 HSV come agente oncolitico

1.5.1 Vettori oncolitici HSV-1

Numerose sono le caratteristiche che rendono l'HSV-1 un buon candidato come vettore per la terapia oncolitica rispetto agli altri vettori virali, quali adenovirus, reovirus e vaccinia virus (108). Nonostante il suo naturale neurotropismo, l'HSV-1 è in grado di infettare una vasta gamma di cellule, anche di specie differenti. E' un virus citolitico per natura (il ciclo replicativo del virus si conclude con la lisi della cellula ospite). L'esteso genoma (152 Kb) ben caratterizzato comprende numerosi geni non essenziali che possono essere sostituiti con multipli transgeni terapeutici. Tra questi geni non essenziali troviamo numerosi geni associati alla neurovirulenza. Sono disponibili in commercio diversi farmaci antierpetici a salvaguardia di una replicazione indesiderata del virus (quali l'aciclovir e il ganciclovir). Il genoma del virus non si integra nella cellula infetta, ma rimane in forma episomiale, anche durante la latenza, precludendo in questo modo la possibilità di mutagenesi inserzionali.

La prima generazione di vettori virali oncolitici è stata caratterizzata da mutazioni in singoli geni che avevano lo scopo di restringere la replicazione virale in cellule in attiva divisione. Il primo vettore HSV-1 geneticamente ingegnerizzato per la terapia oncolitica è stato il *ΔlspTK* (109), un mutante HSV-1 delevato per la timidina chinasi (TK). La TK virale è richiesta per il metabolismo dei nucleotidi ed è essenziale per la replicazione del DNA virale in cellule post mitotiche, ma l'over-espressione della TK umana in cellule cancerose compensa per questo difetto. Martuza e colleghi (109) hanno testato il *ΔlspTK* per il suo potenziale terapeutico in gliomi umani impiantati in modelli murini immunodeficienti, e hanno osservato una riduzione significativa del tumore e un aumento della sopravvivenza. Poiché il gene TK è richiesto per l'azione della maggior parte dei farmaci antivirali la sua delezione ha posto una serie di questioni concernenti la sicurezza e ne ha messo in discussione il suo utilizzo in pazienti umani. Un altro limite di questo primo costrutto virale è stata la neurotossicità che si osservava ad alte dosi.

hrR3 è un altro esempio di HSV-1 oncolitico di prima generazione che porta l'inserzione del gene reporter di *E. coli* β-galattosidasi nel locus del gene virale ICP6, inattivandolo (110). Il gene virale ICP6 codifica per la subunità larga della ribonucleotide riduttasi (RR), che risulta essenziale per la sintesi *de novo* dei deossiribonucleotidi. In modo analogo ai mutanti deleti nella TK, i mutanti RR deleti replicano meglio in cellule tumorali, che compensano per la perdita della RR virale esprimendo alti livelli di RR umana. In modelli animali, hrR3 si è dimostrato meno neurovirulento rispetto al *ΔlspTK* e sensibile all'aciclovir e ganciclovir, per la presenza del gene intatto che codifica per la timidina chinasi (111). Un altro gruppo di vettori oncolitici HSV-1 di prima generazione contiene la delezione del gene γ34.5, il gene virale che svolge un ruolo

cruciale nel determinare la neurovirulenza. Il prodotto del gene $\gamma 34.5$ blocca lo spegnimento della sintesi proteica cellulare innescato dall'infezione virale. L'espressione di questa proteina inoltre, facilita la replicazione virale in cellule non in attiva divisione, come i neuroni, contribuendo allo sviluppo di encefaliti. Mutanti HSV-1 deleti in $\gamma 34.5$ includono il virus 1716, del ceppo 17, e il virus R3616 del ceppo F, entrambi testati con successo in diversi modelli animali di tumore (25, 112). L'HSV 1716 è stato anche il primo HSV mutato ad essere testato per la sua efficacia tramite inoculazione diretta nella massa tumorale di pazienti affetti da tumore maligno al cervello (113). Un potenziale svantaggio dei virus mutanti $\gamma 34.5$ è che replicano meno efficientemente della controparte *wild-type*.

Nell'ottica di massimizzare la sicurezza, sono stati costruiti vettori oncolitici HSV-1 di seconda generazione contenenti mutazioni multiple in geni virali, in modo che non potessero revertire ad un ceppo più virulento a seguito di mutazioni. A questo gruppo appartiene il vettore oncolitico G207, caratterizzato dalla delezione di entrambi i loci $\gamma 34.5$ e dalla mutazione nella regione ICP6, che ne aumentano la specificità per cellule in attiva divisione, come quelle tumorali (114). Sebbene G207 sia stato inizialmente concepito per il trattamento dei tumori al cervello, studi *in vitro* e *in vivo* ne hanno dimostrato l'efficacia anche su diversi tipi di tumori solidi, inclusi il melanoma, il cancro al seno, al colon, alla vescica e alla prostata (115). Un dato interessante emerso da studi in modelli animali immunocompetenti, è stato che l'inoculazione intratumorale di G207, induce una risposta immunitaria antitumorale sistemica, che portava alla regressione di un tumore distale e alla resistenza alla re-inoculazione con cellule tumorali autologhe. Pertanto in questi sistemi, G207 agisce da vaccino anti-tumore *in situ* (116). I buoni risultati ottenuti nei numerosi esperimenti sul modello animale hanno permesso a questo virus di completare la fase I e II per il trattamento dei gliomi maligni (87) (NCT00028158).

Come evidenziato dagli studi condotti con il virus G207 in animali immunocompetenti, l'efficacia terapeutica degli HSV-1 oncolitici deriva dalla combinazione di due meccanismi d'azione: la diretta attività citotossica del virus e l'induzione indiretta della risposta immunitaria antitumorale (117). L'effetto bimodale è stato dimostrato usando modelli di tumori bilaterale singenici, nei quali l'inibizione della crescita tumorale si osservava sia nei tumori inoculati col virus che nei tumori controlaterali, non inoculati (116).

Di conseguenza, sono stati sviluppati vettori HSV-1 di terza generazione con l'obiettivo di stimolare la risposta immunitaria nel microambiente tumorale, o eliminando la down-regolazione da parte del virus delle molecole MHC I o inserendo nel genoma virale citochine regolatorie.

Il vettore virale G47 Δ deriva dal backbone del virus G207 e presenta in più la delezione del gene $\alpha 47$ che codifica per la proteina ICP47, responsabile dell'inibizione del trasportatore associato alla presentazione dell'antigene (118). Nelle cellule cancerose infette, la delezione di ICP47

induce un aumento dell'espressione delle molecole MHC di classe I e di conseguenza aumenta l'immunità antitumorale attraverso la presentazione dell'antigene (119). Nella maggior parte delle linee testate, la replicazione del virus G47 Δ è risultata migliore del G207, con una resa virale ed effetto citopatico migliori (120). Attualmente è in corso il trial clinico di fase II in Giappone per il trattamento del glioblastoma (UMIN000015995) (84).

Ai vettori virali esprimenti citochine appartengono i ricombinanti NV1034 ed NV1042 che producono, rispettivamente, il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi (GM-CSF) e l'interleuchina 12 (IL-12) (121). GM-CSF svolge numerose funzioni, incluso il reclutamento dei monociti dal sangue periferico e l'attivazione di monociti e cellule dendritiche per la presentazione dell'antigene alle cellule T, un evento iniziale critico nella risposta immunitaria anti-tumorale (83). L'IL-12 è una citochina pro-infiammatoria che stimola la risposta immunitaria locale. E' espressa dalle cellule presentanti l'antigene, i linfociti B e monociti. Uno dei suoi effetti quello di stimolare la produzione di interferone gamma e TNF- α dalle cellule T e NK per incrementarne l'attività citotossica. Svolge anche una attività angiogenica (122).

Il T-Vec (talimogene laherparepvec, IMLYGIC, già OncoVEX GM-CSF), è stato approvato nel 2015 negli USA e nel 2016 in Europa per il trattamento del melanoma in stadio avanzato (4). E' un HSV-1 che presenta la delezione di entrambe le copie del gene γ 34.5 e del gene α 47, e l'inserzione del gene umano che codifica per il GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi) nei locus deleti di γ 34.5 (80). La delezione del gene α 47 facilita inoltre l'espressione precoce del gene U_S11, che si traduce in un incremento della replicazione nelle cellule infette. E' un HSV-1 derivato da un isolato clinico (JS-1) al fine di evitare l'utilizzo di un ceppo di laboratorio che potrebbe aver perso il suo potenziale oncolitico dopo diversi passaggi in coltura.

1.5.2 HSV-1 oncolitici non attenuati reindirizzati al tumore

La maggior parte degli herpes simplex virus oncolitici mostra un elevato profilo di sicurezza grazie a strategie di attenuazione. Questi virus sono caratterizzati da mutazioni in proteine che contrastano la risposta cellulare antivirale, incluse la risposta immunitaria, l'apoptosi, l'autofagia, e dipendono strettamente dalla proliferazione cellulare tumorale. Tuttavia, è emerso chiaramente che abolendo completamente l'espressione di alcune proteine virali si attenua la replicazione virale, anche in cellule tumorali, poiché queste proteine virali spesso hanno funzioni multiple (76). In poche parole, la sicurezza è stata ottenuta a spese della virulenza tramite singole o multiple mutazioni/delezioni (123). Un altro limite di questa strategia è che la replicazione virale è strettamente dipendente dai difetti intrinseci nel tumore e non prende in considerazione

l'elevata eterogeneità all'interno delle masse tumorali. Per superare quindi i limiti imposti dall'attenuazione, una strategia alternativa è quella del cosiddetto reindirizzamento recettoriale, già discusso nei paragrafi precedenti, che si propone di alterare lo spettro d'ospite del virus, modificando le proteine virali coinvolte nel riconoscimento della superficie cellulare, senza però compromettere l'abilità del virus di penetrare nella cellula. Questa tipologia di reindirizzamento comporta l'abrogazione del tropismo naturale del virus e l'acquisizione di quello tumorale, rendendo il virus tumore specifico. Virus ingegnerizzati in questo modo mantengono la completa capacità litica del ceppo parentale. In teoria, questa strategia offre il vantaggio di poter usare virus molto virulenti e/o a dosi maggiori, poiché capace di infettare solo cellule tumorali e diminuire quindi la tossicità della viroterapia.

Come descritto nei paragrafi precedenti, l'ingresso di HSV-1 inizia con il legame della glicoproteina D a uno dei suoi recettori naturali, HVEM o nectin1 (11, 124). Questo legame innesca una serie di cambiamenti conformazionali in gD, che segnala l'attivazione al complesso gH/gL che a sua volta trasmette il segnale alla glicoproteina gB, che infine esegue la fusione (34).

Il primo virus HSV col tropismo modificato è stato ottenuto eliminando la regione che lega l'eparan solfato in gB ed inserendo l'eritropoietina (EPO) nella regione N-terminale parzialmente deleta di gC (125). Il virus risultante, KgBpK-gC-, legava in maniera specifica il recettore per l'EPO, mentre la gD era ancora in grado di interagire coi suoi recettori naturali.

Successivi studi sulle modifiche dello spettro d'ospite di HSV-1 si sono focalizzati quindi sull'ingegnerizzazione di gD. Zhou e Roizman hanno ingegnerizzato l'interleuchina 13 (IL-13) tra l'aa 24-25 di gD. L'IL-13 è il ligando del recettore dell'interleuchina 13-2 α (IL-13R2 α), espressa nel glioblastoma. Il virus così ingegnerizzato era reindirizzato all'IL-13R2 α e de-reindirizzato da HVEM (126).

Campadelli e colleghi hanno scelto di reindirizzare il virus verso il recettore HER-2 (recettore per il fattore di crescita epidermico umano 2). HER-2, membro della famiglia dei recettori EGFR, è sovra-espresso nel 25% dei tumori della mammella e dell'ovaio, nel 30% dei tumori gastrici e nel 20% dei tumori al polmone (127). Le attuali terapie basate su anticorpi monoclonali ed inibitori peptidici hanno portato a limitati benefici di sopravvivenza a causa dell'instaurarsi di fenomeni di resistenza e recidive tumorali, che includono metastasi cerebrali HER-2 positive (128). Sono stati generati due HSV-1 oncolitici completamente reindirizzati verso HER-2 che differiscono nella regione di gD deleta ai fini dell'eliminazione del tropismo naturale (Fig. 10). La gD del virus ricombinante R-LM113 è deleta della porzione N-terminale che comprende gli aa 6-38, (94, 129), mentre nella gD dell'R-LM249 la delezione comporta l'eliminazione della regione centrale degli aa 61-218 (51). In entrambi i virus, il frammento anticorpale variabile a

catena singola (scFv) diretto contro HER-2 è stato inserito nelle regioni delete di gD (Fig. 1.10). Il scFv HER2 è stato derivato dal trastuzumab, un anticorpo monoclonale umanizzato, utilizzato nella pratica clinica, che lega HER-2 ad alta affinità (29,3 nM) (130). Per quanto concerne la sicurezza, le delezioni nella gD escludono la possibilità che il virus possa revertare in un virus *wt*. Inoltre, nel caso imprevisto che una stessa cellula venga infettata contemporaneamente da un virus ricombinante e da un *wt*, gli eventi di ricombinazione potrebbero dare origine solamente a due virus parentali.

L'effetto terapeutico di R-LM113 ed R-LM249 è stato dimostrato in esperimenti preclinici, per il trattamento del cancro umano al seno e alle ovaie e nel modello murino di glioblastoma HER-2 positivo (51, 94, 129, 131, 132). R-LM249, inoculato attraverso la via intraperitoneale, ha esercitato anche un effetto terapeutico distale, sulle metastasi peritoneali e cerebrali di tumori ovarici e mammari (131). R-LM249, somministrato per via sistemica mediante cellule *carrier*, esercita effetti terapeutici contro metastasi polmonari e cerebrali (107). Il reindirizzamento osservato in cellule in coltura si è rivelato vero anche nei sistemi *in vivo*. Evidenze della replicazione di R-LM249 si sono trovate esclusivamente nei siti di cellule neoplastiche, anche nei topi in cui R-LM249 è stato somministrato attraverso la via intraperitoneale (131). Glorioso e Grandi hanno scelto come bersaglio il recettore EGFR, sovra-espresso in un certo numero di tumori, tra cui il glioblastoma. Al fine del de-indirizzamento gD porta la delezione degli aa 2-24 (de-indirizzamento da HVEM) e una mutazione nell'aa 38 (Y38C, de-indirizzamento da HVEM da nectina1). Anche in questo caso, il scFv diretto contro EGFR è inserito nella delezione di gD (133). Le modifiche in gD sono state combinate con mutazioni in gB (D285N e A549T), che aumentano la velocità d'ingresso del virus (133). Il virus reindirizzato verso EGFR esercita effetti terapeutici in un modello murino ortotopico di glioma primario umano (133). Tenendo conto delle strategie di Campadelli e Glorioso-Grandi, l'approccio di reindirizzamento generale di HSV-1 consiste nella delezione e sostituzione della regione comprendente gli aa 6-38 in gD.

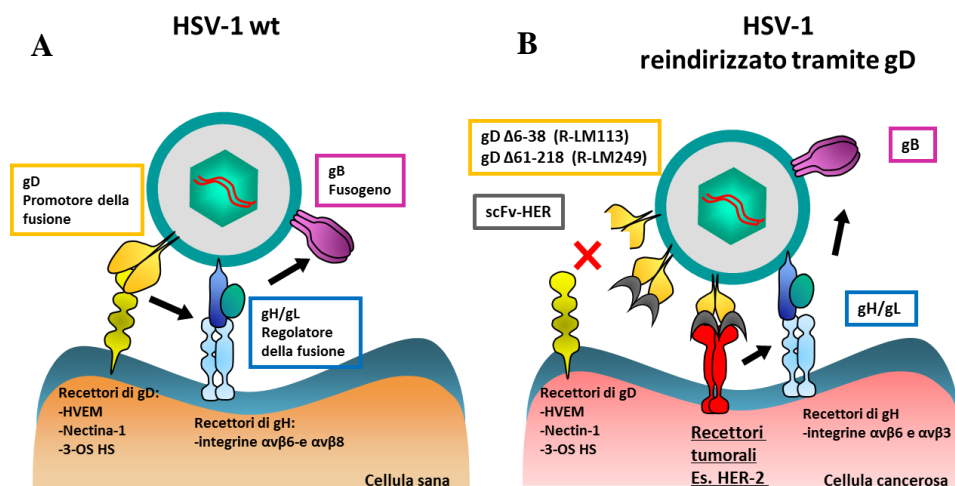


Fig. 1.10 Strategia di reindirizzamento del tropismo di HSV-1 ad un recettore specifico del cancro. A) Interazioni essenziali nell'ingresso di HSV-1 *wt*. gD è attivata dall'interazione con uno dei suoi recettori naturali, nectin1 o HVEM. L'attivazione è trasmessa al complesso gH/gL, che è anche attivato dalle integrine ($\alpha\beta6$ -e $\alpha\beta8$). L'attivazione infine è segnalata a gB, che esegue la fusione dell'envelope con la membrana cellulare. B) Il reindirizzamento di HSV-1 tramite modificazioni genetiche in gD. gD porta la delezione della regione 6-38 o 61-218, che previene l'interazione di gD con i suoi recettori naturali. La porzione di gD deleta è sostituita da un scFv diretto contro il recettore HER-2, sovra-espresso in diversi tipi di tumore. L'interazione della proteina chimerica gD-scFv attiva gD, che a sua volta trasmette il segnale a gH/gL ed infine a gB (91).

1.6 I recettori EGFR

La famiglia dei recettori tirosin-chinasici ErbB (o EGFR, recettori del fattore di crescita dell'epidermide) comprende quattro recettori distinti: l'EGFR (noto anche come ErbB-1/HER1), l'HER2 (ErbB-2, neu), l'HER3 (ErbB-3) e l'HER4 (ErbB-2). Tutte le proteine di questa famiglia sono caratterizzate da un dominio extracellulare che lega il ligando, un dominio transmembrana e un dominio citosolico con attività tirosin-chinasica. La regione extracellulare è suddivisa, a sua volta, in quattro domini (Fig.1.11), dei quali il dominio I e III sono coinvolti nel legame del ligando, mentre il dominio II è essenziale per la omo- ed eterodimerizzazione che innesca la cascata di segnalazione (134). I recettori EGFR, HER3 ed HER4, in assenza del ligando, esistono in una conformazione chiusa, nella quale il dominio II di dimerizzazione non è esposto, e quindi non disponibile per l'interazione con gli altri recettori. Diversamente, il recettore HER2 si presenta in una conformazione costitutivamente attiva e disponibile alla dimerizzazione in assenza del ligando. Il dominio intracellulare tirosin-chinasico è altamente conservato all'interno della famiglia dei recettori ErbB, contrariamente al dominio extracellulare che presenta un'elevata variabilità, suggerendo una diversa specificità dei recettori per i ligandi. Il legame di un fattore di crescita della famiglia EGF (*epidermal growth factor*) induce l'omo- o l'eterodimerizzazione dei recettori ErbB, con la conseguente attivazione del dominio tirosin-chinasico.

Sono stati identificati tutti i possibili complessi omo- ed etero-dimerici tra i recettori della famiglia ErbB. La via di segnalazione porta all'attivazione dei pathway di ras/raf/MEK/MAPK che regolano la crescita cellulare, proliferazione, differenziazione, angiogenesi. Il segnale di attivazione è inattivato principalmente tramite l'endocitosi del complesso recettore-ligando (135).

Il ruolo dei recettori ErbB e dei loro ligandi nella patogenesi dei carcinomi umani è confermato da numerosi studi che ne hanno dimostrato una amplificazione genica o iper-attivazione nella maggior parte delle formazioni neoplasiche solide. In media, dal 50% al 70% dei carcinomi del polmone, colon e seno mostrano una over-espressione di EGFR o ErbB3 (136, 137). Il recettore HER-2, è sovra-espresso nel 25% dei tumori della mammella e dell'ovaio, nel 30% dei tumori gastrici e nel 20% dei tumori al polmone (127). L'espressione di HER4 è stata principalmente investigata nei tumori al seno, il 50% dei quali esprime questa tipologia di recettore. E' importante in questo caso sottolineare l'alta frequenza di una co-espressione dei diversi recettori all'interno di un tumore e questo fenomeno potrebbe svolgere un ruolo importante nella patogenesi. Di fatto, la co-espressione di differenti recettori ErbB è associata ad un fenotipo tumorale più aggressivo e una prognosi peggiore (138).

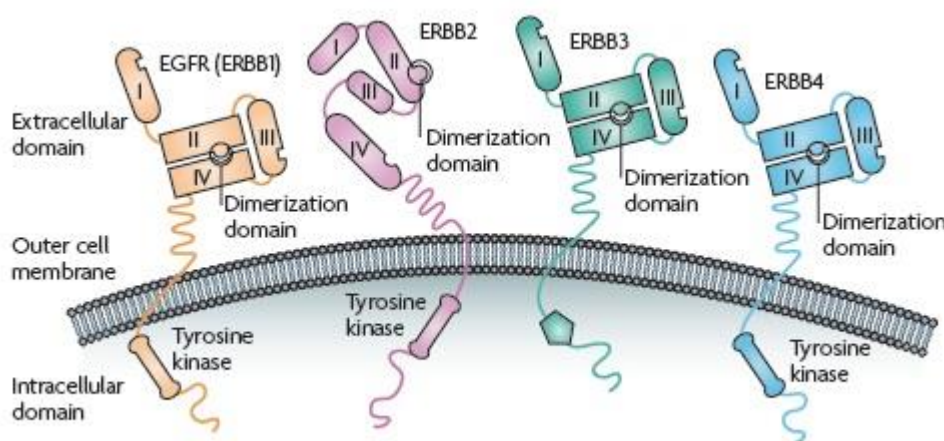


Fig. 1.11 Organizzazione dei domini dei recettori ErbB. I recettori EGFR, ErbB3 ed ErbB4, in assenza del ligando, mostrano una conformazione chiusa, nella quale il dominio II di dimerizzazione non è esposto, e quindi non disponibile per l'interazione con gli altri recettori. Diversamente, il recettore HER2 si presenta in una conformazione costitutivamente attiva e disponibile alla dimerizzazione (139).

EGFR

Considerato il ruolo di EGFR nella progressione di molte tipologie di carcinoma, sono state sviluppate diverse molecole in grado di interferire selettivamente con gli effetti EGFR-mediati. Tra queste, vi sono gli anticorpi monoclonali e i peptidi inibitori del dominio tirosin-chinasico. Gli anticorpi monoclonali diretti contro EGFR, sono stati specificamente disegnati per legare la

regione extracellulare del recettore, prevenendo la dimerizzazione e il *signaling* a valle (140). Oltre ad inibire la via di segnalazione, questi anticorpi monoclonali inducono l'internalizzazione del recettore, la sua degradazione e *down*-regolazione. Un altro meccanismo d'azione degli anticorpi monoclonali (diretti non solo verso EGFR) è quello relativo alla mediazione della citotossicità mediata da anticorpo ADCC (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity*) (141). Un esempio di MAb diretto contro EGFR è il Cetuximab (nome commerciale Erbitux), un anticorpo chimerico umano-murino approvato dalla FDA per il trattamento dei pazienti affetti da carcinoma metastatico del colon-retto e dal carcinoma a cellule squamose di testa e collo (142). Il Lapatinib (nome commerciale Tykerb) appartiene invece alla classe dei farmaci inibitori dell'attività tirosin-chinasica di entrambi i recettori EGFR (ErbB1) e HER2 (ErbB2). E' indicato per il trattamento del carcinoma mammario avanzato o metastatico, in particolare per tumori HER2 positivi che sono già stati trattati con trastuzumab e che non possono più beneficiare del trattamento con il MAb (143, 144).

HER2

HER2 è un recettore orfano, cioè privo di un ligando conosciuto in grado di attivarlo. La conformazione costitutivamente attiva e disponibile alla dimerizzazione del recettore lo rendono un partner ideale di dimerizzazione con gli altri membri della famiglia EGFR.

L'HER2 mostra, tra i recettori ErbB, la più potente attività chinasica e gli eterodimeri aventi HER2, sono caratterizzati da una forte attività di segnalazione (145).

La dimerizzazione con HER2 attiva una cascata di segnalazione che regola la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, l'invasione e l'angiogenesi (146). In particolare, la via di segnalazione HER2-mediata svolge un ruolo essenziale nell'embriogenesi del cuore. In modelli animali, di fatti, embrioni deleti per il recettore HER2 muoiono per disfunzioni del miocardio (147).

Ad eccezione del cuore, HER2 è poco espresso nei tessuti sani di un uomo adulto (148). HER2 è over-espresso in circa 25% dei tumori alla mammella e la sua amplificazione si osserva anche nel cancro ovarico, nel carcinoma gastrico e nel carcinoma polmonare non a piccole cellule (135). I tumori al seno in cui HER2 è amplificato sono caratterizzati da un elevato tasso di proliferazione, aneuploidia, tendenza a metastatizzare al sistema nervoso centrale e alle viscere, resistenza alle terapie endocrine e prognosi infausta (145).

La differenza nell'espressione tra il tumore e i tessuti sani, rendono HER2 un bersaglio ideale nella terapia del cancro. Come per l'EGFR, l'FDA ha approvato diversi farmaci per il trattamento del cancro HER2-positivo. Oltre al già citato Lapatinib, per il trattamento dei tumori HER2 positivi, in clinica sono disponibili diversi anticorpi monoclonali. Il trastuzumab (nome

commerciale Herceptin) è un anticorpo monoclonale umanizzato che riconosce il dominio extracellulare IV di HER2 (130). E' indicato per il trattamento di pazienti con carcinoma mammario metastatico con iper-espressione di HER2. Diverse evidenze sperimentali indicano come principale meccanismo d'azione anti-tumorale, la risposta immunitaria legata alla citotossicità mediata da anticorpo (ADCC) (149). Tuttavia, trastuzumab non è efficace contro tumori che esprimono bassi livelli di HER2 e solo un terzo dei pazienti affetti da tumore metastatico della mammella HER2 positivo risponde al trattamento (150, 151). Inoltre, circa il 70% dei pazienti che inizialmente rispondono al trattamento, nell'arco di un anno osservano una recidiva della progressione della malattia metastatica, suggerendo che l'insorgenza di una resistenza "secondaria" o "acquisita" al trattamento col trastuzumab è molto frequente (128).

2. Scopo

Lo scopo di questa tesi di dottorato è il miglioramento e l'ampliamento di vettori oncolitici, sicuri ed efficaci, basati sul virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) opportunamente ingegnerizzati per riconoscere come bersaglio un recettore tumorale specifico.

Ad oggi, l'unico virus oncolitico approvato per l'uso clinico è un HSV-1 attenuato, caratterizzato da mutazioni e delezioni in proteine che contrastano la risposta cellulare antivirale. La sicurezza è stata ottenuta a spese della virulenza. Per superare i limiti imposti dall'attenuazione, una strategia alternativa è quella di alterare lo spettro d'ospite del virus. La glicoproteina di membrana gD è il fattore chiave per la penetrazione di HSV-1 nelle cellule, perché il suo legame ad uno dei suoi recettori cellulari attiva le glicoproteine gH/gL e gB che eseguono la fusione. Di fatto, finora gD è stata l'unica glicoproteina che ha permesso di reindirizzare con successo il tropismo di HSV-1.

Il progetto di ricerca nel quale si inserisce il lavoro di questa tesi prevede lo sviluppo di virus herpes simplex 1 (HSV-1) oncolitici, reindirizzati a recettori tumore-specifici, per condurli alla fase traslazionale. Per esplorare nuove strategie di reindirizzamento nel disegno di virus herpes simplex 1 si è proceduto secondo i seguenti punti:

1. modifica del tropismo di HSV-1, tramite ingegnerizzazione di un ligando eterologo nella porzione N-terminale di gH. Il ligando eterologo scelto è un frammento anticorpale variabile a catena singola (scFv) diretto contro il recettore HER2, un recettore orfano, sovra-espresso in diversi tumori. Il virus gH-reindirizzato è stato analizzato per la sua capacità replicativa ed oncolitica *in vitro*.
2. Il passo successivo è stato combinare le modifiche in gD con quelle in gH al fine di ottenere un HSV-1 oncolitico diretto contemporaneamente contro due recettori tumorali distinti, HER2 ed EGFR. In questo caso, oltre alla caratterizzazione *in vitro*, l'obiettivo è stato anche la messa a punto di un modello *in vivo* col quale studiare l'efficacia oncolitica del virus.
3. E' stato modificato il tropismo di HSV-1 ingegnerizzando un scFv-HER2 nella porzione N-terminale della glicoproteina fusogenica gB, e si sono sfruttate le conoscenze apprese dagli studi di reindirizzamento per comprendere più a fondo i meccanismi coinvolti nella penetrazione di HSV-1 nella cellula.
4. La produzione di un HSV-1 oncolitico in una linea tumorale non è compatibile con la sperimentazione clinica. Nell'ultima sezione si mostrerà l'ingegnerizzazione di un virus bispecifico in grado di utilizzare alternativamente due recettori, per infettare le cellule tumorali o le cellule produttrici non tumorali. Un reindirizzamento è stato conseguito tramite l'inserzione in gD di un scFv diretto verso il recettore HER2, mentre il secondo reindirizzamento è stato

conseguito inserendo in gB un peptide di 20 aa derivato dal fattore di trascrizione di lievito GCN4. Parallelamente, è stata generata la linea Vero-GCN4R, che esprime come recettore un scFv derivato da un anticorpo monoclonale che lega l'epitopo GCN4 con alta affinità.

3. Materiali e metodi

3.1 Cellule

In questa tesi sono state utilizzate le seguenti cellule, suddivise in base all'espressione del recettore tumorale HER-2.

Cellule HER-2 positive

Di origine umana: SK-OV-3 (adenocarcinoma ovarico), SK-BR-3, MDA-MB-453, BT-474 (adenocarcinoma mammario), HT-29 (adenocarcinoma del colon).

Di criceto: le J-HER2 derivano da cellule J stabilmente trasfettate con il plasmide pcDNA-HER2 che codifica per il recettore umano HER-2 (129). La linea cellulare CHO-HER2 è stata generata dalle cellule CHO (cellule di ovaio di criceto cinese) per trasfezione del plasmide pcDNA-HER2 (129). Sono mantenute in costante selezione con l'antibiotico G418 (400 µg/ml).

Di scimmia: Vero (cellule renali di cercopiteco verde) esprimono l'ortologo di scimmia del recettore HER-2. La linea Vero-GCN4R è stata generata dalla linea Vero per trasfezione col plasmide scFv_GCN4_Nectin1 (vedi paragrafo successivo). Sono mantenute in costante selezione con l'antibiotico G418 (400 µg/ml).

Cellule HER-2 negative

Di origine umana: MDA-MB-231 (adenocarcinoma mammario), HaCaT (cheratinociti) HeLa (cancro della cervice uterina), SK-N-SH (neuroblastoma), HFF14 (fibroblasti).

Di criceto: BHK (cellule renali di criceto neonatale); le cellule J derivano dalla linea BHK e non esprimono i recettori nectina1 e HVEM per cui risultano resistenti all'infezione da HSV-1 (152). Le linee cellulari J-HVEM, J-nectina1, J-EGFR e J-HER2 sono state generate da cellule J per trasfezione dei singoli recettori. Sono mantenute in costante selezione con l'antibiotico G418 (400 µg/ml) (129, 152, 153). CHO-KI, CHO-nectina1 sono state generate dalle cellule CHO per trasfezione dei singoli recettori.

Le cellule sono state mantenute nel Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplementato con il 5-10% di siero fetale bovino (FBS) (Gibco), PenStrep (1%; Euroclone) ad eccezione delle SK-OV-3, BT-474, MDA-MB-453, MDA-MB-231 coltivate in RPMI 1640 Glutamax (Gibco) con l'aggiunta di PenStrep e 10% FBS inattivato a 56°C per 30 minuti. Tutte le cellule sono state mantenute in sterilità a 37°C in atmosfera a 5% di CO₂.

Ad eccezione delle cellule J e delle linee derivate da queste, tutte le linee cellulari sono state acquistate dall'ATCC (*american type culture collection.*).

3.1.2 Generazione della linea Vero-GCN4R

La linea cellulare Vero-GCN4R esprime un recettore chimerico artificiale, formato dal scFv diretto contro il peptide GCN4 (154) (GenBank: AF416613.1), fuso alla nectina1. Il peptide GCN4 è stato derivato dal fattore di trascrizione del lievito GCN4 (Fig. 3.1 A). Il recettore chimerico, raffigurato e descritto in Fig. 3.1 B, è stato sintetizzato in vitro da Gene Art e clonato nel plasmide pcDNA3.1-Hygro_A069, generando il plasmide scFv_GCIN4_Nectin1. Il DNA dal plasmide scFv_GCIN4_Nectin1 è stato trasfettato in cellule Vero mediante Lipofectamine 2000. Cellule Vero esprimenti il recettore artificiale per il peptide GCN4 sono state selezionate mediante igromicina (200 µg/ml), e successivamente separate mediante sfere magnetiche. Cloni singoli sono stati analizzati al citofluorimetro per l'espressione del scFv GCN4. Abbiamo accertato, al citofluorimetro, che durante passaggi seriali della linea cellulare Vero-GCN4R, l'espressione del recettore artificiale rimanesse stabile dopo 40 passaggi consecutivi.



Fig. 3.1 - Caratteristiche del peptide GCN4 e del corrispettivo recettore chimerico GCN4R. A) Sequenza amminoacidica del peptide GCN4. In rosso sono indicati i residui che formano l'epitopo, in blu residui fiancheggiando l'epitopo e presenti nel fattore di trascrizione GCN4 *wt*; i residui in nero (GS) costituiscono un linker Gly-Ser non presente nella sequenza *wt* del GCN4. B) Rappresentazione schematica del recettore chimerico GCN4R. Il recettore è formato da un peptide segnale all'N-terminale (in viola), una sequenza tag di HA di (in giallo), il scFv diretto contro il peptide GCN4, fiancheggiato da due corti linker (GA e GSGA), i residui Met143-Val517, della nectina1 umana, che includono i domini extracellulari 2 e 3, il segmento transmembrana TM e la coda citoplasmatica.

3.2 Plasmidi

Il plasmide pSG-ScFvHER2-SG, che codifica per il scFv diretto contro l'HER2 è stato gentilmente donato dal Prof. Alfredo Nicosia (Nouscom, Castel Romano). La sequenza del scFv HER2 è stata derivata sulla base di informazioni pubblicate (155) e dalla sequenza 18 dal brevetto WO2004065416, Genbank CQ877234. Il plasmide pTNHaa-aEGFR, che codifica per il scFv diretto contro l'EGFR, è stato gentilmente donato dal Dr. Steve Russel (Mayo Clinic, Rochester) (93). Il plasmide scFv_GCIN4_Nectin1 è stato acquistato dalla Gene Art. Il plasmide pGalK è stato ricevuto dal Dr. Ulrich Koszinowski (Max von Pettenkofer-Institut, Monaco, Germania). Il plasmide pcDNA3.1-Hygro_A069 è stato acquistato dalla Gene Art.

3.3 Virus di controllo

HSV-1 (F)

Il ceppo F di HSV-1 è stato originariamente isolato da lesioni faciali e mantenuto a un numero basso di passaggi da Roizman B. e colleghi (156). Aliquote di HSV (F) ci sono state gentilmente fornite dal Dott. Roizman B. (Università di Chicago). E' un virus *wt*, che non ha subito modificazioni genetiche, ed è pertanto utilizzato come controllo, in confronto ai virus ricombinanti.

R-LM5

Il virus R-LM5, porta l'inserzione di sequenze derivate dal plasmide pBeloBAC11 per la replicazione del genoma virale come cromosoma artificiale batterico (BAC) (94, 157) in *E. coli* (vedi 3.5 "La ricombinazione *galK*") e l'inserzione del gene reporter *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) sotto il controllo del promotore virale (di HSV-1) precoce $\alpha 27$ al fine di monitorarne l'infezione in fluorescenza (Fig. 3.2). Tutti i virus ricombinanti descritti in questo lavoro portano le sequenze BAC inserite nella stessa regione e differiscono, come verrà descritto in seguito, per le glicoproteine di superficie, diversamente ingegnerizzate, e per il gene reporter. R-LM5 è un virus fenotipicamente *wt*, ed è pertanto utilizzato come controllo, in confronto ai virus che portano, modificazioni ulteriori, rispetto all'inserzione delle sequenze BAC e dei geni reporter.

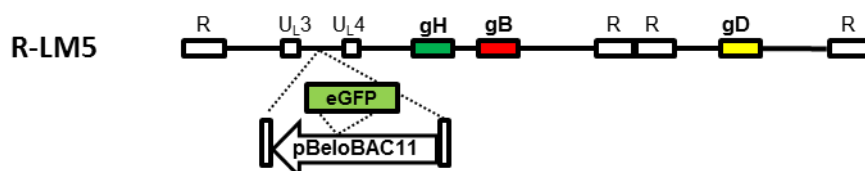


Fig. 3.2 - Rappresentazione schematica del genoma di R-LM5. Le sequenze BAC, fiancheggiate da siti *LoxP* (raffigurati come dei rettangoli) sono inserite nella regione intergenica U_{L3} - U_{L4} . La eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) posta sotto il controllo del promotore virale (di HSV-1) precoce $\alpha 27$ è introdotta nelle sequenze BAC. Il resto del genoma virale (compresi i geni che codificano le glicoproteine dell'envelope gH, gB, e gD) è *wt* (94).

R-LM611

Il virus ricombinante R-LM611 deriva dall'R-LM5. R-LM611, usato come controllo e non descritto in altre pubblicazioni, è stato ingegnerizzato durante questo studio dalla Dott.ssa L. Menotti. Rispetto al virus R-LM5, il ricombinante R-LM611 porta il scFv diretto contro l'EGFR I nella delezione 6-38 della glicoproteina D (Fig. 3.3).

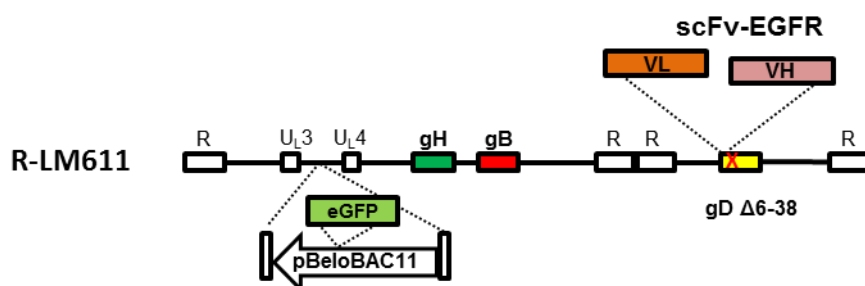


Fig. 3.3 - Rappresentazione schematica del genoma di R-LM611. La glicoproteina D di R-LM611 porta, nella delezione 6-38, il scFv diretto contro EGFR. Le sequenze BAC, fiancheggiate dai siti LoxP (raffigurati come dei rettangoli) sono inserite nella regione intergenica U_{L3}-U_{L4}. La eGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) sotto il controllo del promotore virale (di HSV-1) precoce $\alpha 27$ è introdotta nelle sequenze BAC.

R-LM113

Il virus R-LM113 è descritto nel lavoro (94). La gD del virus ricombinante R-LM113 è deleta della porzione N-terminale che comprende gli aa 6-38, nella quale è inserito il frammento anticorpale variabile a catena singola (scFv) diretto contro HER2. Porta l'inserzione del reporter *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) e delle sequenze BAC nelle stesse regioni indicate per l'R-LM5. In Fig. 3.4 è riportata la struttura della glicoproteina D chimerica.

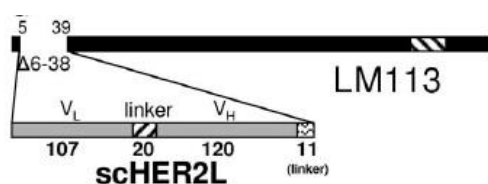


Fig. 3.4 - La glicoproteina D del virus ricombinante R-LM113. Il scFv HER2 con un linker terminale di 11 glicine-serine è stato inserito nella delezione 6-38 di D. Le regioni VL e VL del anticorpo 4D5 HER2 sono uniti da un linker di 20 aa. (94).

3.4 Anticorpi

L'anticorpo monoclonale (MAb) BD80 diretto contro gD, è stato gentilmente donato dal Dott. G.H. Cohen (Università della Pensilvenia). I MAb HD1 e H126 sono stati forniti dalla Dott.ssa L Pereira (Università della California). Il MAb H1817 diretto contro gB è stato acquistato dalla Goodwin Institute. Il PAb diretto contro gH/gL è stato derivato dalla forma solubile di gH e descritto altrove (55). I MAb 52S, 53S, sono descritti altrove (158). Il MAb 52S reagisce verso un epitopo conformazionale di gH, il MAb 53S reagisce verso un epitopo conformazionale di gH dipendente dalla presenza di gL. Le IgG murine sono state acquistate dalla ditta Sigma-Aldrich.

Il MAb trastuzumab (130) che lega l'HER2 umano è stato fornito dalla ditta Genentech.

3.5 La ricombinazione galK

Tutti i virus ricombinanti riportati in questa tesi sono stati generati tramite la “ricombinazione galK” utilizzando la tecnologia del cromosoma artificiale di batterio (BAC). Questa tecnica, che si basa sul gene galK (galattochinasi) come marker di selezione, rende possibile modificare il DNA BAC via ricombinazione omologa (159). Sfrutta un ceppo mutante di *E.coli* (SW102) delemto nel gene galK che rende i batteri incapaci di crescere su un terreno minimo con il galattosio come unica fonte carbonata. Tuttavia la funzione del gene galK può essere ripristinata in *trans*, ricostituendo l'abilità di metabolizzare il galattosio. Il ceppo SW102 inoltre porta il sistema di ricombinazione del profago λ sotto il controllo di un repressore temperatura-sensibile, che inibisce l'espressione della ricombinasi a 30°C. Quando i batteri sono portati ad una temperatura di 42°C la ricombinasi è attivamente espressa e media la ricombinazione tra le sequenze BAC (nel nostro caso si tratterà di un BAC che codifica il genoma di HSV-1) ed un DNA esogeno che avrà il transgene di interesse fiancheggiato da sequenze omologhe al BAC target. Lo schema di selezione prevede due passaggi (Fig. 3.5). In primo luogo, la cassetta galK, contenente sequenze omologhe ad una posizione specifica nel BAC, viene inserita nel BAC tramite ricombinazione omologa. I batteri ricombinanti saranno ora in grado di crescere su un terreno minimo contenente galattosio come unica fonte di carbonio. Il primo passaggio dunque è una selezione positiva. Nel secondo passaggio, la cassetta galK viene sostituita da un oligo (a singolo o doppio filamento), un prodotto di PCR, o un frammento di DNA clonato che porta la mutazione desiderata fiancheggiata dalle stesse braccia di omologia utilizzate nel primo step. Nel secondo step si opera perciò una selezione negativa contro la cassetta galK grazie alla resistenza al 2-deossi-galattosio (DOG) su piastre minime con glicerolo come fonte di carbonio. Il DOG è un composto innocuo, a meno che non venga fosforilato da una galattochinasi (galK) funzionale. La fosforilazione da parte del galK converte il DOG nel 2-deossi-galattosio-1-fosfato, un intermedio non metabolizzabile, per cui tossico per i batteri. Dalle risultanti colonie resistenti al DOG, alcune colonie in *background* avranno perso la cassetta galK tramite una delezione e non avranno inserito il transgene, mentre il resto delle colonie sarà rappresentato da cloni ricombinanti.

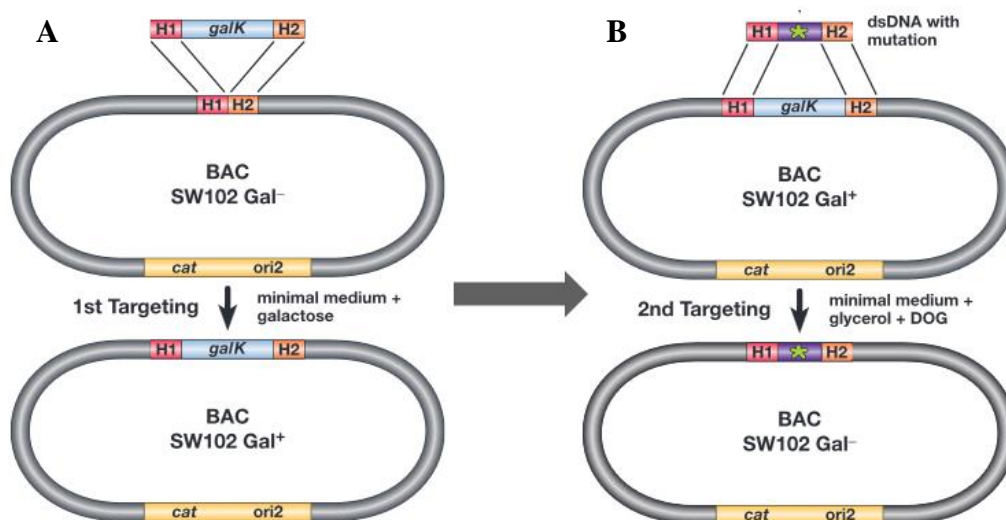


Fig. 3.5 - La tecnologia della ricombinazione galk. A) Il risultato del primo evento di ricombinazione è l'inserzione del gene galk in una posizione definita del BAC per mezzo di una selezione positiva su terreno minimo contenente galattosio e cloramfenicolo. I batteri sono fenotipicamente Gal⁺. B) Nel secondo step, la cassetta galk viene sostituita da un oligo, un prodotto di PCR, o un frammento di DNA clonato, che porta la mutazione desiderata (indicata con una stella verde) fiancheggiata dalle stesse braccia di omologia utilizzate nel primo step. I cloni ricombinanti si selezionano per la resistenza al 2-deossi-galattosio (DOG) in un terreno che contiene il glicerolo come unica fonte di carbonio. I batteri divengono fenotipicamente Gal⁻. H1 e H2 braccia di omologia; cat, gene della cloramfenicolo acetil transferasi; ori2, origine di replicazione del BAC; galk, gene della galattochinasi di *E. coli*. Modificato da (159).

3.5.1 Il protocollo

1° Step: inserzione del galk

Il gene galk è stato amplificato con il primer forward (5'-50bp-omologiaT GTT GAC AAT TAA TCA TCG GCA-3') in combinazione con il primer reverse (5'-50bp-omologia al filamento complementare-TCA GCA CTG TCC TGC TCC TT-3') con il seguente protocollo: 94° C 15 secondi, 60° C 30 secondi, 72° C 1 minuti per 30 cicli. I primer utilizzati nel 1° step sono elencati nella tabella 3. Due µl di enzima DpnI sono stati aggiunti per ogni 50 µl di reazione PCR, che è successivamente stata incubata a 37 ° C per un ora per permettere la digestione del plasmide utilizzato come stampo. Il prodotto di PCR è stato purificato da gel per mezzo del kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega). Una singola colonia del ceppo SW102 contenente il BAC da modificare è inoculato in 3 ml di LB a basse concentrazione saline e cloramfenicolo alla concentrazione di 12,5 µg/ml a 30° C.

Tutti i BAC HSV-1 ricombinanti descritti in questa tesi sono derivati originariamente dal BAC pYEbac102, che codifica per il genoma completo di HSV-1 (157). Nel pYEbac102, le sequenze BAC pBeloBAC11 (GenBank Accession: U51113), fiancheggiate da siti *LoxP*, sono inserite

nella regione intergenica del genoma di HSV-1 tra U_L3 e U_L4. Nel paragrafo successivo saranno descritti, per ogni virus ricombinante, i BAC utilizzati come *backbone* di partenza, gli intermedi di ricombinazione, e i BAC risultanti al termine della ricombinazione galK.

Il giorno seguente, 3 ml della coltura batterica di SW102 sono diluiti in 100 ml di LB (a bassa concentrazione salina) e cloramfenicolo e lasciati in agitazione a 30° C fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ di 0.55-0.6. La coltura viene quindi, suddivisa in due bottiglie che vengono poste in agitazione per 15' a 42° o 30° C per il campione indotto e non indotto, rispettivamente. Al termine dell'induzione, i campioni sono trasferiti in tubi falcon da 50 ml (precedentemente raffreddati) e centrifugati a 3000 rpm per 8' a 0° C. Il surnatante viene eliminato e il pellet risospeso in 5 ml di H₂O sterile fredda tramite gentile agitazione manuale in un bagno di acqua/ghiaccio. Una volta risospeso, il campione viene portato a volume (50 ml) con H₂O e di nuovo centrifugato. Al termine del secondo lavaggio, il surnatante è completamente rimosso e 50 µl di pellet batterico sono elettroporati con 30 ng dell'amplificato galK. Si utilizzano cuvette da 0,2 cm (BioRad) e si imposta lo strumento Gene Pulser II (Bio-Rad) a 25 mF, 2,5 kV e 200 ohm. Segue incubazione dei batteri in 1 ml di LB per 1 h a 30°C. Al termine dell'incubazione, si centrifuga la coltura e il pellet batterico viene sottoposto a due lavaggi con la soluzione M9 1x. Si piastrano diverse diluizioni su piastre minime M63 addizionate di cloramfenicolo e galattosio come unica fonte carbonata. Le piastre sono riposte a 30° C. Circa cinque giorni dopo, le colonie dovrebbero essere visibili solo nelle piastre piastrate con il campione indotto. Per verificare la presenza del galK, si strisciano le colonie singole su piastre McConkey, addizionate di 1% di galattosio e cloramfenicolo 12,5 µg/ml. Colonie satellite saranno incolore, mentre i batteri galK+ formeranno colonie di un rosso intenso. Le colonie rosse galK+ sono ugualmente analizzate in *colony*-PCR per la presenza del gene galK con i primer galK_129_f (5'acaatctctgtttgc caacgcattgg 3') e galK_417_r (5'cattgccgctgatcaccatgtccacgc3').

2° Step: sostituzione del galK col gene d'interesse

Per iniziare il 2° step, occorre aver amplificato, digerito col DpnI e purificato dal gel d'agarosio, l'inserto che si andrà a sostituire al galK. I primer utilizzati nel 2° step sono elencati nella tabella 4. Successivamente, colonie rosse galK+ provenienti dalla piastre McConkey sono inoculate in 3 ml di LB (a basse concentrazioni saline) e cloramfenicolo a 12.5 µg/ml per tutta la notte a 30° C. Seguono passaggi analoghi a quelli seguiti nel 1° step di ricombinazione, fino all'elettroporazione. 50 µl di cellule elettrocompetenti indotte e non indotte sono elettroporate con 200 ng del DNA dell'inserto. Il periodo di incubazione in agitazione che segue l'elettroporazione si effettua in 10 ml di LB, a 30°C per 4 ore. Dopo due lavaggi con la soluzione M9 1x, si piastrano diverse diluizioni su piastre minime M63 addizionate di cloramfenicolo,

glicerolo come fonte di carbonio e DOG 0,2%. Le piastre sono riposte a 30° C. Dopo cinque giorni di incubazione, le colonie sono visibili sia nelle piastre con i batteri indotti che non indotti e la differenza in numero è variabile. Il 2° step di selezione è meno stringente; di fatti molte colonie satellite avranno perso il galK senza aver introdotto il gene d'interesse. Un numero minimo di 30 colonie è analizzato per *colony*-PCR per la presenza del gene d'interesse.

Il terreno minimo e le piastre indicatori sono stati preparati utilizzando le seguenti soluzioni.

Il terreno Luria-Bertani (a bassa concentrazione salina per evitare lo scoppio della cuvette durante l'elettroporazione)

1% Triptone

0.5% Estratto di lievito

0.5% Sodio cloruro

Per le piastre agar è stato aggiunto l'1,5% di agar

Soluzione di lavaggio M9 (1X)

0.6% Na₂HPO₄

0.3% KH₂PO₄

0.1% NH₄Cl

0.05% NaCl

Soluzione M63(5X)

1% (NH₄)₂SO₄

6.8% KH₂PO₄

0.0025% FeSO₄·7H₂O

Si porta a pH 7 con KOH

Piastre Gal+ per la selezione positiva (1°step):

M63 1X + agar (15 g/l) + D-galattosio (0.2%; Sigma) + D-biotina (1 mg/l; Sigma) + L-leucina (45 mg/l; Sigma) + cloramfenicolo (12.5 µg/ml; Sigma).

Piastre DOG+ per la selezione negativa (2°step):

1xM63 + agar + glicerolo (0.2%; Sigma) + D-biotina (1 mg/l) + L-leucina (45 mg/l; Sigma) + DOG (0.2%; Sigma) e cloramfenicolo (12.5 µg/ml).

Piastre indicatori: agar MacConkey (Difco, BD Biosciences) + 1% D-galattosio + cloramfenicolo (12.5 µg/ml).

I BAC R-801, R-803, R-809, R-805, R-903, R-909 ed R-313 che sono l'oggetto di studio di questa tesi, sono stati generati con la tecnologia di ricombinazione galK. (Fig. 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11).

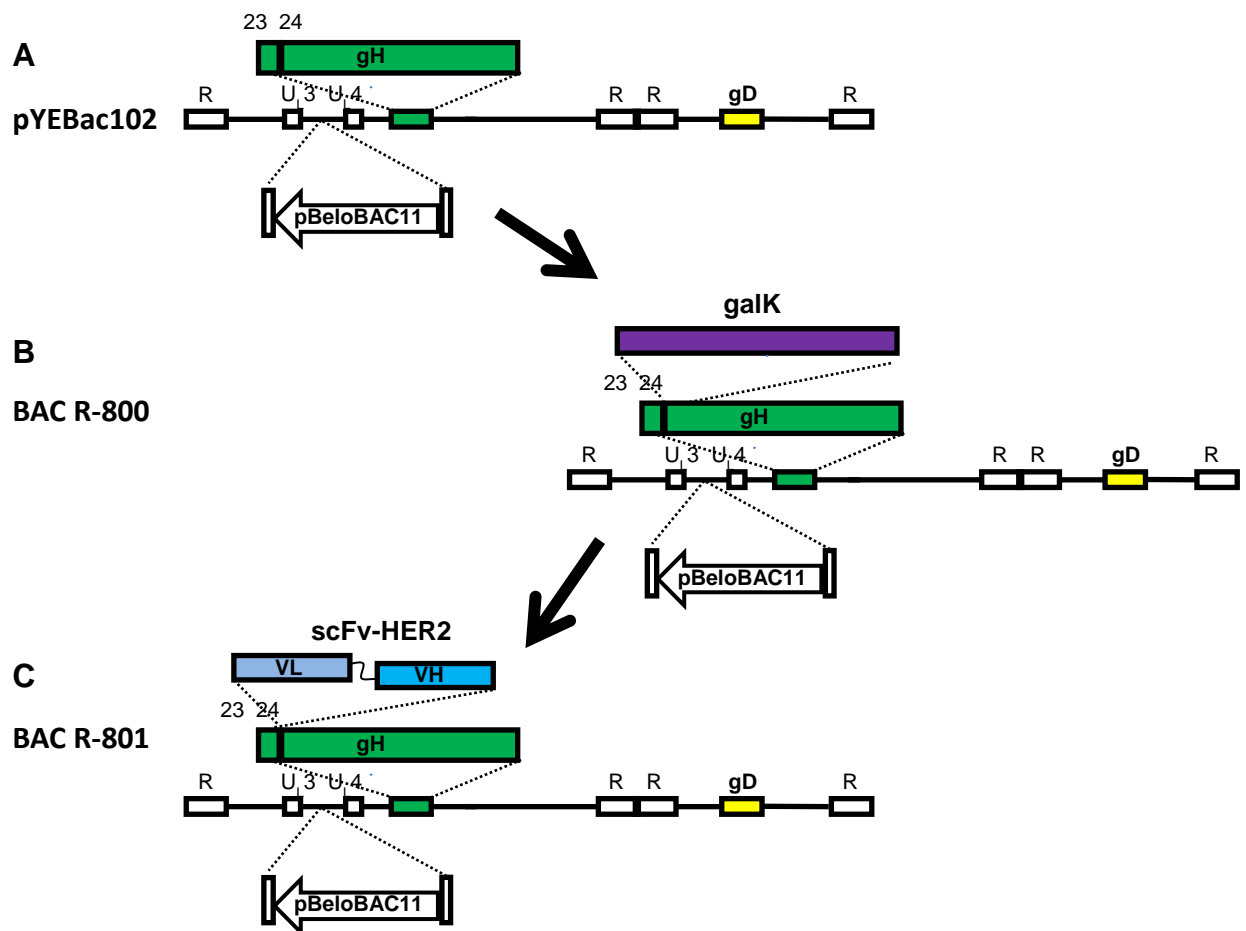


Fig. 3.6 - Rappresentazione schematica della generazione del BAC R-801. A-B) La cassetta galK è stata inserita tra gli aa 23 e 24 della gH del BAC pYEBac102, generando l'intermedio BAC R-800. C) Il BAC R-800 diventa R-801, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con l'inserto che codifica per il scFv-HER2 (i primer utilizzati nella ricombinazione sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

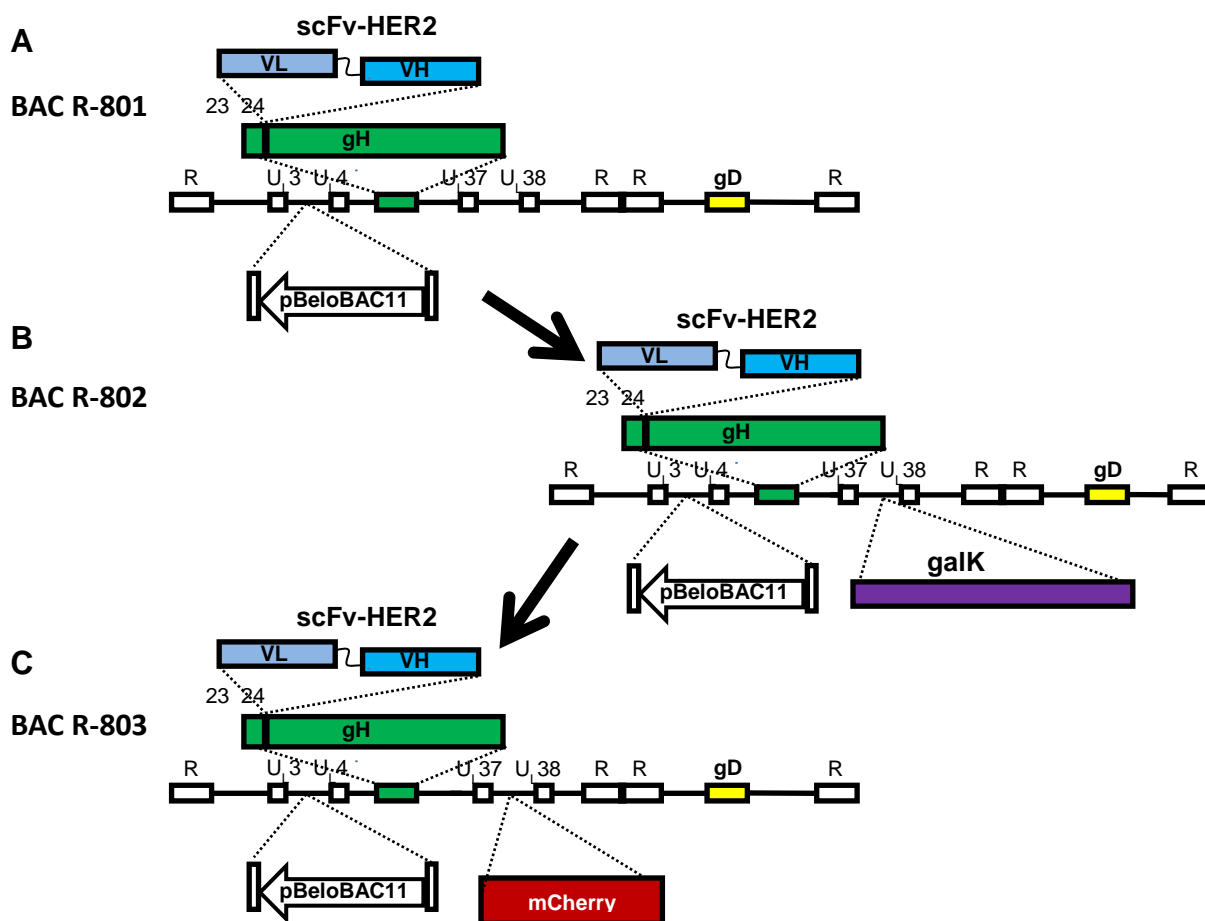


Fig. 3.7 - Rappresentazione schematica della generazione del BAC R-803. A-B) La cassetta galK è stata inserita tra regione intergenica, tra UL37 e UL38 (coordinate 84156–84157 del genoma di HSV-1 F) del BAC R-801, generando l'intermedio BAC R-802. C) Il BAC R-802 diventa R-803, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con l'inserto che codifica per la proteina reporter mCherry (i primer utilizzati nella ricombinazione sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

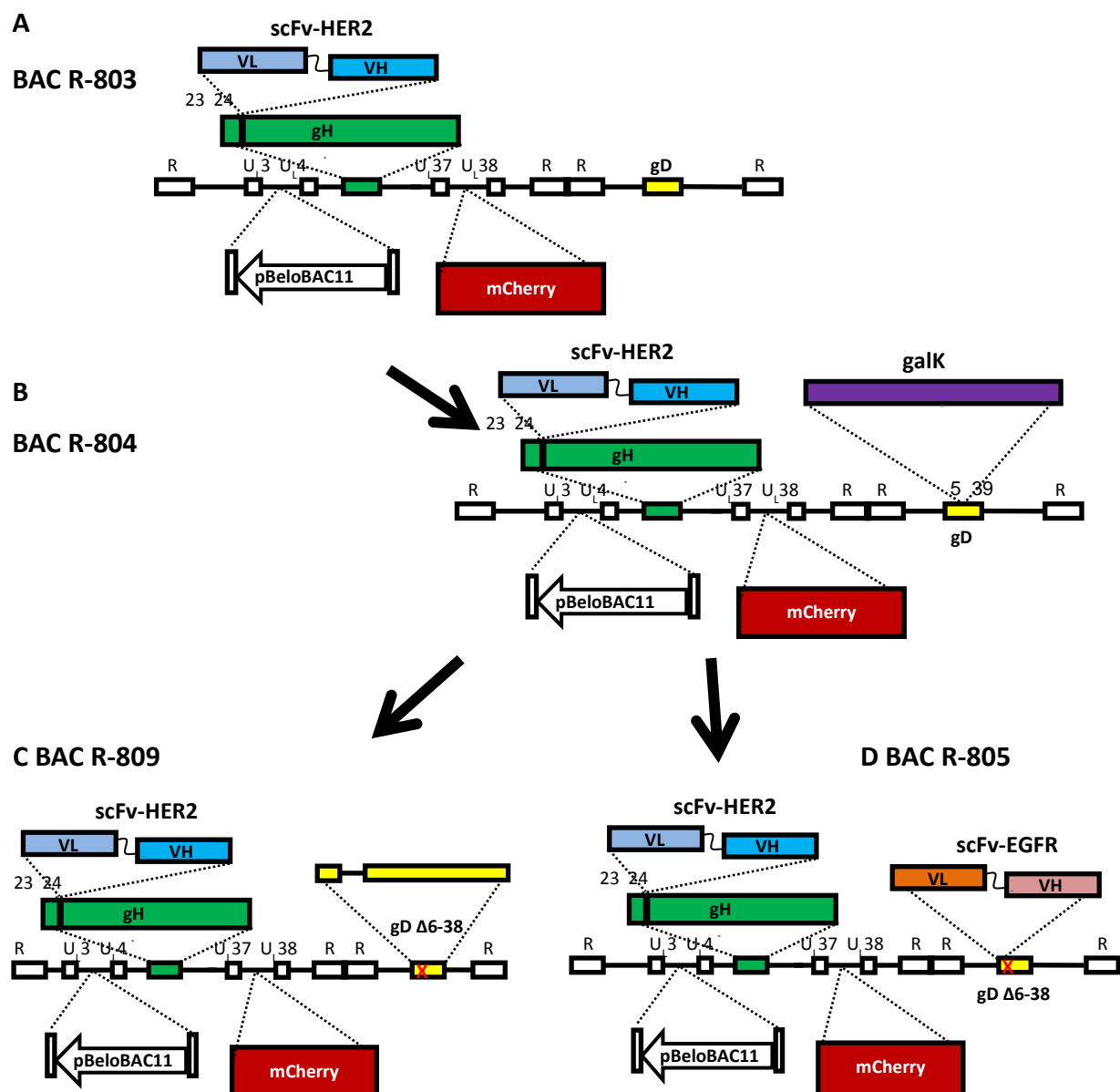


Fig. 3.8 - Rappresentazione schematica della generazione dei BAC R-809 ed R-805. A-B) La cassetta galK è stata inserita tra gli aa 5 e 39 della gD del BAC R-803, generando l'intermedio BAC R-804, che a questo punto porta la delezione degli aa 6-38 di gD. C) Il BAC R-804 diventa R-809, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con un oligonucleotide a doppio filamento della gD comprendente la delezione degli aa 6-38. D) In alternativa, il BAC R-804 da luogo a R-805, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con un scFv diretto contro l'EGFR (i primer utilizzati nella ricombinazione sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

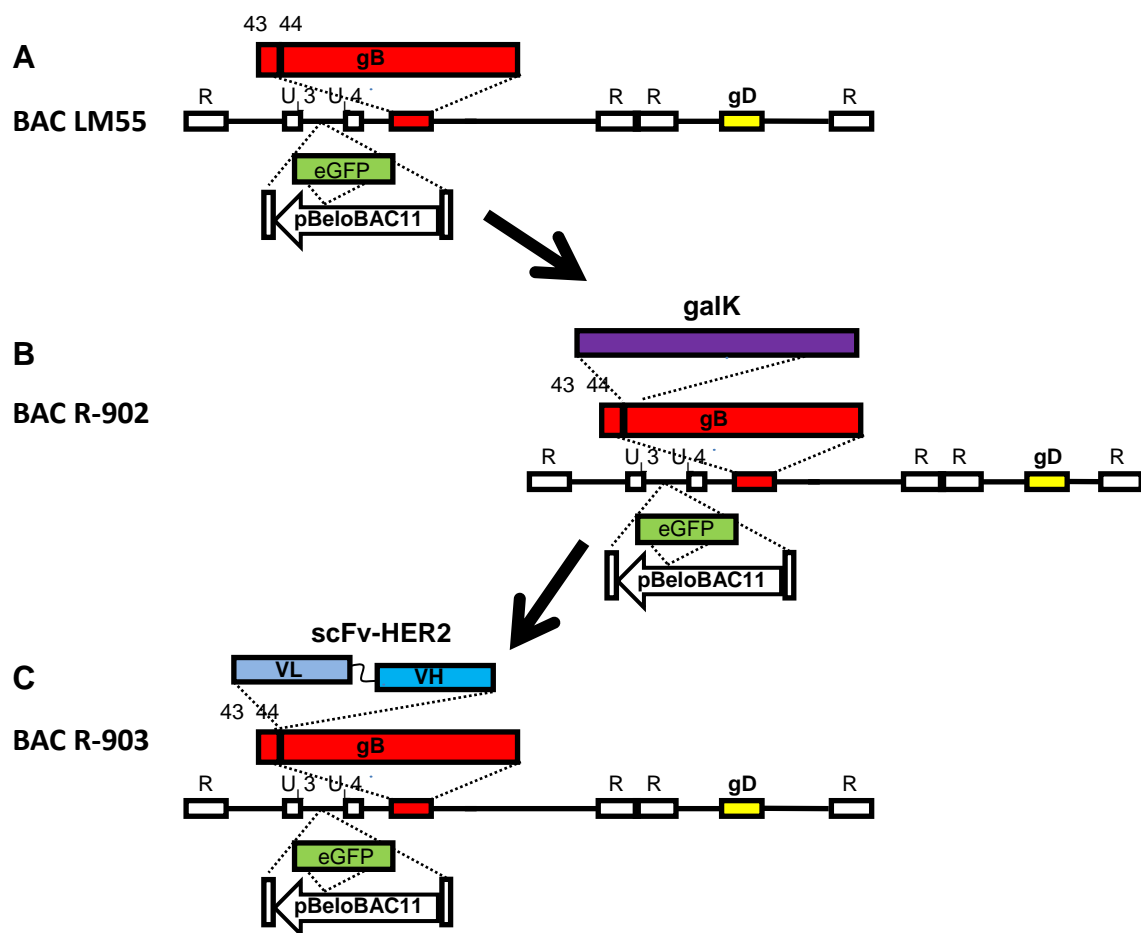


Fig. 3.9 - Rappresentazione schematica della generazione del BAC R-903. A-B) La cassetta galK è stata inserita tra gli aa 43 e 44 della gB del BAC LM55, generando l'intermedio BAC R-902. C) Il BAC R-902 diventa R-903, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con l'inserto che codifica per il scFv-HER2 (i primer utilizzati nella ricombinazione sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

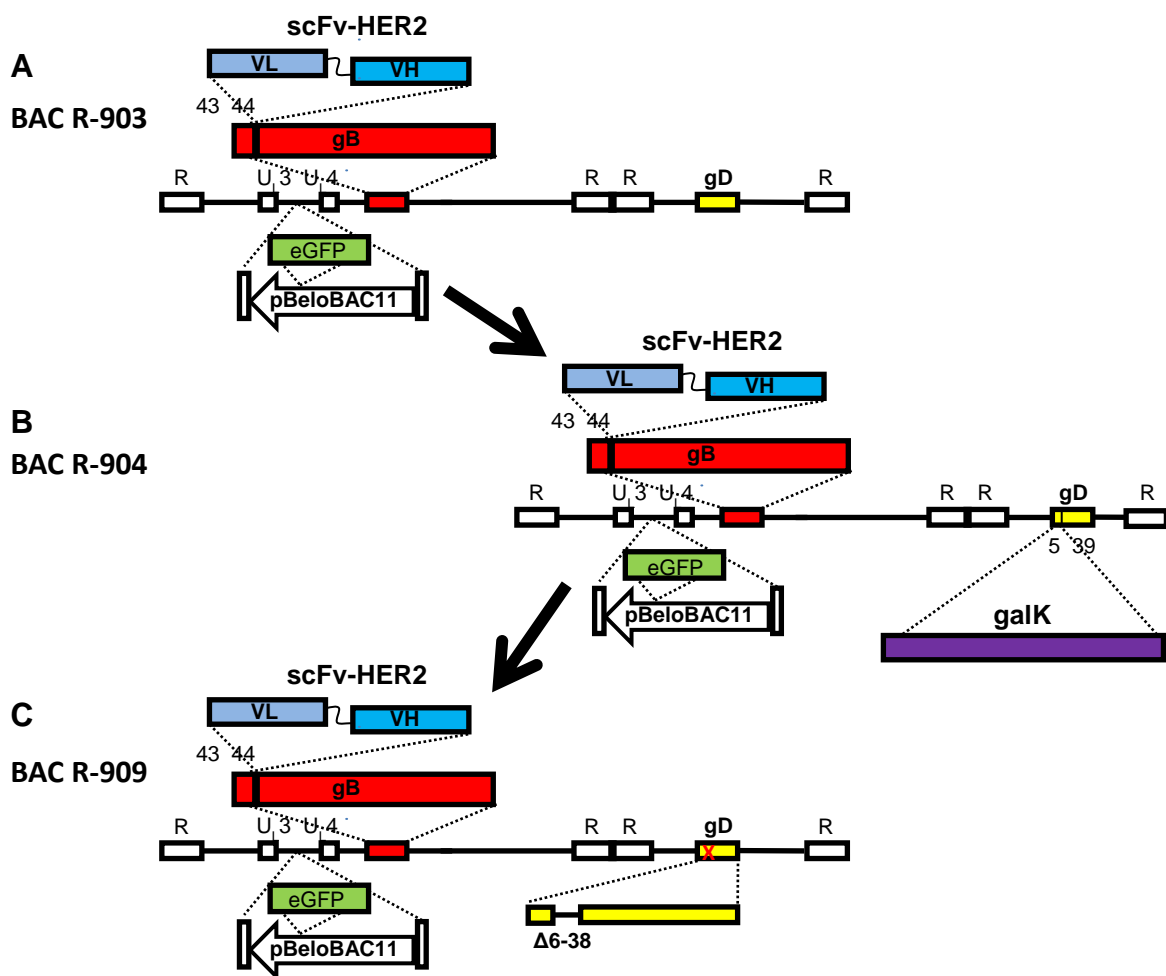


Fig. 3.10 - Rappresentazione schematica della generazione del BAC R-909. A-B) La cassetta galK è stata inserita tra gli aa 5 e 39 della gD del BAC R-903, generando l'intermedio BAC R-904, che a questo punto porta la delezione degli aa 6-38 di gD. C) Il BAC R-904 diventa R-909, dopo il secondo step della ricombinazione galK, nel quale il gene galK è sostituito con un oligonucleotide a doppio filamento della gD comprendente la delezione degli aa 6-38 (i primer utilizzati nella ricombinazione sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

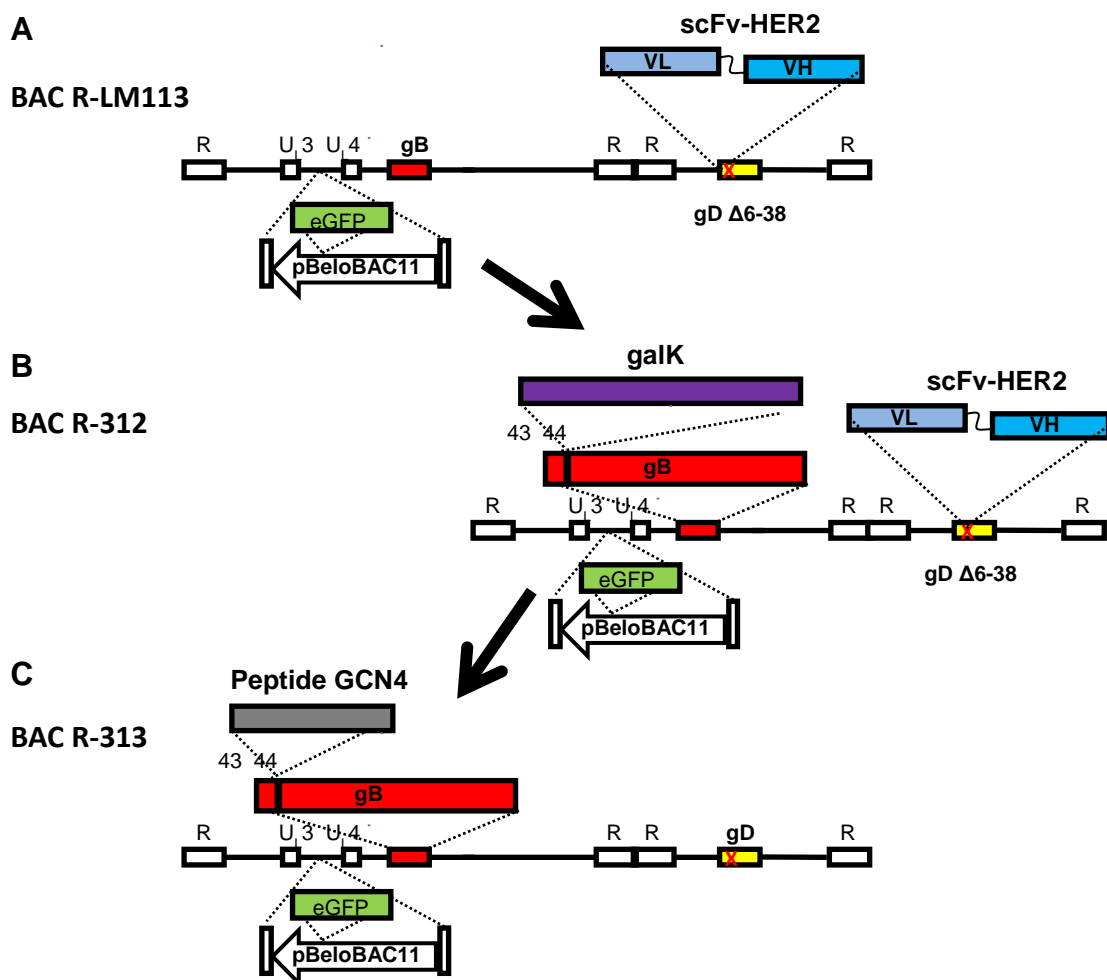


Fig. 3.11 - Rappresentazione schematica della generazione del BAC R-313. A-B) La cassetta *galK* è stata inserita tra gli aa 43 e 44 della *gB* del BAC R-LM113, generando l'intermedio BAC R-312. C) Il BAC R-312 diventa R-313, dopo il secondo step della ricombinazione *galK*, nel quale il gene *galK* è sostituito con l'inserto che codifica per peptide GCN4 (i primer utilizzati sono elencati nelle tabelle 3.1 e 3.2).

Tabella 3.1 - Primer utilizzati nel 1° step di ricombinazione, per inserire la cassetta galK.

Primer	Sequenza 5'→3'	BAC HSV-1
gH6_galK_f	atcggtccatgcccaggccatccaaaaacatgggtctgtctgctcagtcctgttgacaattaatcatcgga	R-800
gH5_galK_r	tcgtgggggttattattttggcggttgcgtggggcaggtccacgactggcagcactgtctgtcctt	R-800
UL37/38_galK_f	ccgcaggcgttgcgagtagcccggtcttcgcggggtgttatagggccaccctgttgacaattaatcatcgga a	R-802
UL37/38_galK_r	tccggacaatccccgggctgggtccgcgaacgggatgccgggacttaacagcactgtcctgtcctt	R-802
gD5_galK_f	ttgtcgtcatagtggtccatgggtccgcggcaaatatgccttggcgctgttgacaattaatcatcgga	R-804
gD39_galK_r	atcgggaggctgggggctggaacgggtccgtagggccgctggatgtgtcagcactgtcctgtcctt	R-804
gB43GalKfor	ggtggcgtcggcggtccgagttccccggcacgcctggggtcgcggccgcctgttgacaattaatcat cggca	R-902/R-312
gB43GalKrev	ggccagggcgggcgccggcgagtggcaggtccccgttcgccgctgggttcagcactgtcctgtc ctt	R-902/R-312

Tabella 3.2 - Primer utilizzati nel 2° step di ricombinazione per il *knock out* della cassetta galK e per l'inserzione del costrutto finale.

Primer	Sequenza 5'→3'	BAC HSV-1
gH23_8SG_scFv4D5_f	tcgtgggggttattattttggcggttgcgtggggtcaggtccacgactggcatagtagtg cgggtggctctggatccg	R-801
scFv4D5_358_r	ggaaacgggtcggatcagccatcgg	R-801
UL37/38_CMV_mcherry_f	ccgcaggcgttgcgagtagcccggtcttcgcggggtgttatagggccaccgatgtacg ggccagatatacg	R-803
UL37/38_pA_mcherry_1958_r	tccggacaatccccgggctgggtccgcgaacgggatgccgggacttaaccatagag cccaccgcatcc	R-803
gD_aa5_39_f_r	ttgtcgtcatagtggtccatgggtccgcggcaaatatgccttggcgccacatccagg cgggcctaccggaccgttcagccccccagcctcccgat	R-809/R-909
BAC_LM611_f	ttgtcgtcatagtggtccatgggtccgcggcaaatatgccttggcgccgaggtgc aactgcagcagtc	R-805
gD39_11SAG-EGFR_	atcgggaggctgggggctggaacgggtccgtagggccgctggatgtgacttgac tagatgaagcacttctgcggaagattgatctcagttctgtccccg	R-805
gB43_sc4D5_for	ggtggcgtcggcggtccgagttccccggcacgcctggggtcgcggccgcgtccgat atccagatgaccagtcctccg	R-903
gB43_sc4D5_rev	ggccagggcgggcgccggcgagtggcaggtccccgttcgccgctgggtaccg gatccaccggaaccagagcc	R-903
GCN4gB_43_44_fB	ggtggcgtcggcggtccgagttccccggcacgcctggggtcgcggccgcgggatc caagaactaccacctggagaacgagtggtggccagactgaagaagctggtgggcagc	R-313

3.6 Rigenerazione e coltivazione dei virus ricombinanti

Il DNA BAC è stato estratto dal ceppo batterico SW102 per mezzo del kit NucleoBond PC100 (Macherey Nagel) e successivamente quantificato allo spettrofotometro Eppendorf Biophotometer. Per rigenerare il virus in cellule di mammifero, 500 ng di DNA BAC sono stati trasfettati in pozzetti di una piastra 12-well di un monostrato di SK-OV-3 seguendo il protocollo per la Lipofectamina 2000 (Invitrogen). A tre giorni dalla trasfezione, si sono osservate le prime placche virali e si è proceduto al passaggio e amplificazione dei virus. L'infezione è stata monitorata per l'effetto citopatico e per la fluorescenza della proteina marker eGFP (per i virus R-909, R-313) o mCherry (R-VG805 ed R-VG809). Per ottenere un pellet virale concentrato (lo stock virale), il lisato di cellule infette (16 T175 di SK-OV-3 o Vero-GCN4) è stato centrifugato a 2000 rpm per 10' e successivamente sonicato per ottenere un maggior rilascio virale. I virioni extracellulari sono stati raccolti dal surnatante delle cellule infette mediante ultracentrifugazione con il rotore 45Ti della Beckman (14.000 rpm, 1 ora e 10'). Il titolo delle preparazioni cellulari (stock) e dei virioni extracellulari è stato determinato nelle SK-OV-3 o Vero-GCN4 con il saggio di placca in mezzo semisolido. In breve, monostrati di SK-OV-3 o Vero.GCN4 sono stati infettati con diluizioni seriali di stock/virioni extracellulari per 1 ora e 30' a 37°C. A seguito dell'adsorbimento virale, l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule sono state ricoperte con un mezzo nutriente contenente agar. A 5 giorni, si sono contate le placche allo stereomicroscopio e si è risaliti al numero di PFU (*plaque forming unit*) per ml. Gli stock virali ed i virioni extracellulari sono stati conservati in numerose aliquote a -80°C, per evitare cicli di gelo/scongelo che ne abbatterebbero il titolo.

3.7 Immunorivelazione delle glicoproteine virali

Per verificare l'espressione delle proteine chimeriche virali, cellule SK-OV-3 sono state infettate ad una MOI di 3 PFU (*plaque forming unit*) per cellula con i virus ricombinanti e con il virus *wt* R-LM5, per confronto. A 72 ore dall'infezione le proteine sono state estratte dal lisato cellulare, mediante il buffer di lisi PBS star (sodio deossicolato 1%, PBS-A 1 x a volume, IGEPAL 1%). Le proteine, denaturate dal calore, sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilammide con sodiododecilsolfato (SDS-PAGE) e successivamente trasferite dal gel alla membrana PVDF con il sistema di trasferimento Trans-Blot Turbo della Bio-Rad. Le glicoproteine virali sono state infine rivelate, tramite chemiluminescenza, con gli anticorpi (descritti nel paragrafo dedicato) diretti contro le glicoproteine virali gB, gH, gD, gL.

3.8 Tropismo cellulare dei virus ricombinanti

3.8.1 Infezione di cellule J esprimenti singoli recettori

Le cellule di criceto J non esprimono recettori cellulari per l'HSV-1 per cui non vengono infettati dal wt R-LM-5 (152). Le cellule J-HER2, J-HVEM, J-Nectina1 esprimono stabilmente i transgeni per i recettori cellulari HER2, HVEM e la nectina1, rispettivamente (129, 152, 153). Per verificare il corretto tropismo cellulare dei virus ricombinanti, le cellule sopracitate sono state infettate ad una MOI di 3 PFU per cellula per 90' a 37° C. Il titolo è riferito a cellule SK-OV-3. L'infezione è stata monitorata per la fluorescenza verde (eGFP) o rossa (mCherry) a 24 ore dall'infezione.

3.8.2 Infezione di cellule umane cancerose HER2⁺ e HER2⁻

Per verificare la specificità dei virus ricombinanti per il recettore HER2 in cellule umane, le linee cancerose HER2⁺ SK-OV-3, BT-474, MDA-MB-453 e HER2⁻ HeLa e MDA-MB-231 e cellule non cancerose HER2⁻ HaCaT sono state infettate ad una MOI di 3 PFU per cellula per 90' a 37° C. Il titolo è riferito a cellule SK-OV-3. Le fotografie relative all'infezione sono state scattate al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

3.9 Misura della replicazione virale

Cellule SK-OV-3 o Vero-GCN4R sono state seminate in piastre repliche e infettate con i diversi virus ricombinanti ad una molteplicità d'infezione (MOI) di 0,1 PFU (*plaque forming unit*) per cellula per 90 minuti a 37° C. Il virus extracellulare non penetrato nelle cellule è stato inattivato mediante lavaggio con una soluzione a pH 3 (40 mM acido citrico, 10 mM KCl, 135 mM NaCl, pH 3) (160). Le piastre repliche sono state congelate a 3, 24, or 48 ore dall'infezione e la progenie virale (cellule infette e surnatante) è stata sonicata e titolata in cellule SK-OV-3, con il metodo delle placche. I virus R-LM5 o HSV-1(F) sono stati incluso come controllo di un HSV-1 wt.

3.10 Blocco dell'infezione con MAb diretti contro HER2, gB, gH o gD

Monostrati repliche di cellule J-HER2 o SK-OV-3 sono stati pre-incubati con il trastuzumab, l'anticorpo monoclonale (MAb) dal quale è stato derivato il scFv-HER2 o con le IgG murine non immuni alla concentrazione finale di 28 µg/ml. In seguito alla pre-incubazione di un'ora a 37°C con gli anticorpi, le cellule sono state infettate ad una MOI di 3 PFU/cellula (in base al titolo ottenuto nelle SK-OV-3) con i virus ricombinanti o con il wt R-LM5. In alternativa, dove indicato, i virioni sono stati pe-incubati con i MAb diretti contro gD (HD1 1.5 µg/ml, o 30

µg/ml), anticorpi diretti contro gB (H126 fluido di ascite diluito 1:2000), anticorpi diretti contro gH (52S fluido di ascite diluito 1:25) per un'ora a 37° C, e la combinazione virione/anticorpo è stata utilizzata per infettare le cellule per 90 minuti a 37° C. Il MAb HD1 è stato testato anche in combinazione con il trastuzumab. A seguito dell'adsorbimento di 90 minuti, l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule sono state ricoperte con un mezzo contenente gli anticorpi indicati. L'infezione è stata quantificata al citofluorimetro (C6 Accury BD).

3.11 Saggio di citotossicità cellulare

Il saggio di vitalità cellulare è stato eseguito utilizzando la soluzione alamarBlue (Thermo Fisher Scientific), un colorante vitale non tossico, a base di sale di resazurina. Il metodo si basa sulla valutazione del rapporto tra NADPH/NADP, FADH/FAD, FMNH/FMN e NADH/NAD, che aumenta durante la proliferazione cellulare. L'alamarBlue è ridotto da questi intermedi del metabolismo e a questo processo si accompagna una variazione dell'assorbanza del mezzo di coltura che può essere quantificata da un lettore di piastre. In particolare, la forma ridotta e quella ossidata dell'alamarBlue assorbono a 560 e 600 nm, rispettivamente. Cellule SK-OV-3, MDA-MB-453, HT-29 ed MDA-MB-231 sono state seminate in pozzetti di piastre repliche da 96-well (8×10^3 cellule/pozzetto) ed esposte ai virus ricombinanti o al solo terreno, nei campioni controllo, per 90 minuti a 37°C. La molteplicità d'infezione utilizzata è stata calcolata in base al titolo di ciascuna linea cellulare. Al tempo indicato, sono stati aggiunti al terreno di coltura 10 µl/pozzetto di soluzione Alamar Blue. Dopo 4 ore d'incubazione a 37° C si è proceduto alla lettura dell'assorbanza a 560 e 600 nm con il lettore di piastre GloMax Discover System (Promega). Per ogni tempo, la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di riduzione dell'alamarBlue in cellule infette rispetto alle non infette, tenendo presente nei calcoli il contributo del solo terreno.

3.12 Silenziamento delle integrine e RT-PCR

Cellule SK-OV-3 sono state silenziate per i geni delle integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$ per mezzo del kit ON-TARGET plus (Dharmacon), come descritto precedentemente. (43). Le cellule di controllo sono state trasfettate con un siRNA per il E.coli-poliA_0054. Il grado di silenziamento è stato determinato con la RT-PCR, utilizzando la tecnologia delle sonde TaqMan (Applied Biosystems), ed espresso in rapporto alle cellule trasfettate col siRNA di controllo. Ogni colonna rappresenta la media dei triplicati originati da due esperimenti indipendenti \pm S.D. Per studiare l'effetto del silenziamento delle integrine sull'infezione virale, cellule SK-OV-3 silenziate con il siRNA di controllo, o con i siRNA diretti contro le integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$, sono state infettate con il wt R-LM5, R-LM113, R-809 ed R-909 (3 PFU/cellula), e raccolte 16 ore dopo. Il grado d'infezione è

stato quantificato al citofluorimetro. Ogni colonna rappresenta la media dei triplicati \pm S.D..

3.13 Distacco di gL dal complesso so gH/gL

Il distacco di gL può essere monitorato in cellule che sovra esprimono le integrine $\alpha v\beta 6$, confrontando la reattività dei virioni a due diversi anticorpi monoclonali (MAb) diretti contro gH. Il MAb 52S riconosce un epitopo gL-indipendente e riflette la quantità totale di virione adsorbito alle cellule. Il MAb 53S si lega ad un epitopo che si forma solamente quando gH eterodimerizza con gL (epitopo gL-dipendente) (158). Una volta che il virione si adsorbe alla cellula, il distacco di gL può essere rilevato come una diminuzione della reattività del MAb 53S, rispetto alla reattività del 52S (44). Virioni purificati dei virus R-LM5, R-LM113, R-809 ed R-909 sono stati fatti adsorbire per 30 minuti a 37° C a cellule J esprimenti nectina1 + integrine $\alpha v\beta 6$, HER2 + integrine $\alpha v\beta 6$, nectina1 da sola, o HER2 da solo. Al termine dell'adsorbimento, le cellule sono state incubate con gli anticorpi monoclonali 52S o 53S e analizzate al citofluorimetro per la percentuale di cellule positive ai MAb. A conferma del dato ottenuto dalla misura della reattività ai due MAb, si è analizzata la presenza di gL nel mezzo di coltura. Il surnatante delle cellule infettate descritte sopra è stato sottoposto a SDS-PAGE e western blot con gli anticorpi diretti contro gH/gL, gB, e gD.

3.14 Saggio di fusione

La sequenza delle glicoproteine gB_{HER2} , gH_{HER2} , and $gD_{\Delta 6-38}$ è stata amplificata tramite PCR dai virus R-909 ed R-803 e clonata nel plasmide pcDNA3.1(-) (Thermo Fisher Scientific). Il saggio di fusione è stato eseguito secondo il metodo della luciferasi, come descritto (161, 162). Cellule CHO “effettrici” sono state trasfettate con diverse combinazioni delle glicoproteine, mentre le cellule CHO “bersaglio” con la nectina1 o HER2, o senza recettori. Il livello di fusione è stato quantificato con il sistema “*luciferase assay*” (Promega). Ogni valore rappresenta la media di campioni in triplicato.

3.15 Misura della grandezza delle placche

Aliquote di replicati dei virus ricombinanti sono state piastrate su monostrati di cellule SK-OV-3, Vero e Vero-GCN4R per 90' a 37°C. Al termine dell'infezione le cellule sono state ricoperte con un mezzo nutriente semisolido (1% agar, 0,4X DMEM, 6% FBS Δ , RPMI 1640 o DMEM a volume). Per la determinazione della grandezza delle placche, sono state scattate al microscopio a fluorescenza 20 foto per ciascun virus ricombinante, a 72 ore dall'infezione. L'area della placca (in px^2) è stata misurata con il software Nis Elements-Imaging (Nikon). Ogni risultato rappresenta l'area della placca \pm S.D.

3.16 Esperimenti *in vivo*

Tutti gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti nei laboratori del centro GLP della Primm s.r.l di Treviso.

3.16.1 Induzione tumorale

Sono state effettuate due distinte prove di valutazione dell'induzione tumorale. Una prova consisteva nell'inoculo a varie concentrazioni della linea cellulare MDA-MB-453 in matrigel su topi NOD SCID GAMMA (NSG), la seconda prova consisteva nell'inoculo della linea cellulare HT-29 su CD-1 Nude Mouse. Per entrambe le sperimentazioni sono stati utilizzati topi di sesso femminile, di 6 settimane acquistati dalla ditta Charles River Laboratories Italia s.r.l. Per l'induzione tumorale con la linea cellulare MDA-MB-453 2 topi hanno ricevuto per via sottocutanea 5×10^6 cellule e 1 topo 6×10^6 cellule con matrigel. Per la sperimentazione che ha riguardato la linea cellulare HT-29, 2 topi hanno ricevuto per via sottocutanea $2,5 \times 10^6$ cellule e 1 topo 4×10^6 cellule in PBS apirogeno. La crescita della massa tumorale è stata seguita per 4 settimane, mediante calibro millimetrato dal momento della comparsa della massa neoplastica. Al termine della sperimentazione a tutti gli animali è stata effettuata una valutazione autoptica macroscopica al fine di evidenziare eventuali segni di tossicità agli organi interni.

3.16.2 Efficacia anti-tumorale sulla linea cellulare HT-29

Nell'esperimento di efficacia anti-tumorale *in vivo*, in corso, sarà valutata l'attività anti-tumorale dei virus oncolitici R-LM611, R-805 ed R-809 sulla linea cellulare HT-29. Per questa sperimentazione saranno utilizzati topi atimici CD-1 nude di sesso femminile, di 5 settimane acquistati dalla ditta Charles River Laboratories Italia s.r.l.. Venti topi CD-1 saranno suddivisi in quattro gruppi, costituiti da cinque animali ciascuno. A tutti gli animali saranno inoculate a livello del fianco destro $2,5 \times 10^6$ cellule della linea cellulare HT-29 in PBS apirogeno. A distanza di 5, 15, 25 e 35 giorni dall'inoculo delle cellule, i topi del gruppo di controllo riceveranno in sede intratumorale 0,2 ml di PBS apirogeno, mentre i topi dei gruppi di trattamento riceveranno 0,2 ml della sospensione virale contenente 2×10^7 PFU dei rispettivi virus oncolitici. Ogni aliquota di virus sarà preparata diluendo lo stock dei virioni in PBS apirogeno. Gli animali saranno osservati subito dopo le iniezioni e per le prime 24 ore per valutare eventuali stati di malessere quali tremore, convulsioni, diarrea, salivazione, letargia sonnolenza o coma. L'efficacia dei virus oncolitici sarà valutata confrontando le dimensioni delle masse tumorali presenti nei topi dei gruppi di trattamento rispetto a quelle dei topi del gruppo di controllo. La misurazione sarà effettuata mediante calibro millimetrato due volte a settimana.

4. Risultati

4.1 Reindirizzamento di HSV-1 tramite la glicoproteina gH

Il progetto di ricerca ERC (“European Research Council”) nel quale si inserisce il lavoro di questa tesi prevede lo sviluppo virus herpes simplex (HSV) oncolitici, reindirizzati a recettori tumore-specifici, per portarli alla fase traslazionale. Nel laboratorio della Prof.ssa Campadelli sono già stati ingegnerizzati virus ad attività oncolitica (R-LM249 e R-LM113) reindirizzati al recettore tumorale HER2 tramite ingegnerizzazione della glicoproteina virale di membrana D. La glicoproteina gD è il fattore chiave per la penetrazione di HSV-1 nelle cellule, in quanto il suo legame ad uno dei suoi recettori alternativi (HVEM e nectina1), attiva le glicoproteine a valle gH/gL e gB, che infine, eseguono la fusione con la membrana cellulare (11). Di recente, Gianni e colleghi hanno dimostrato che il complesso gH/gL interagisce con le integrine $\alpha\beta 8$ e $\alpha\beta 6$, che agiscono da co-recettori richiesti per l'ingresso (43). Lavori di Atanasiu (163) hanno riportato che mutanti di gH deleti in residui N-terminali (gH Δ 29/gL, gH Δ 48/gL) inducono un basso livello di fusione cellula-cellula in assenza di gD o dei suoi recettori, suggerendo che la forma deleta di gH mimi un intermedio conformazionale nel *pathway* che porta alla attivazione completa della glicoproteina.

Prendendo in considerazione queste recenti osservazioni, abbiamo voluto modificare il tropismo di HSV-1 ingegnerizzando un ligando eterologo nella porzione N-terminale di gH nell’ottica di esplorare nuove strategie di reindirizzamento per il disegno di virus herpes simplex oncolitici.

Il ligando eterologo da noi scelto è un frammento anticorpale variabile a catena singola (scFv) diretto contro il recettore HER2, un recettore orfano, sovra-espresso nel 25% dei tumori della mammella e dell’ovaio, nel 30% dei tumori gastrici e nel 20% dei tumori al polmone.

4.1.1 Ingegnerizzazione dei virus ricombinanti R-803 ed R-809

Tutti i virus ricombinanti riportati in questa tesi sono stati generati tramite la “ricombinazione galK” utilizzando la tecnologia del cromosoma artificiale di batterio (BAC). Questa tecnica, che si basa sul gene galK (galattochinasi) come marker di selezione, rende possibile modificare il DNA BAC via ricombinazione omologa in batteri (159). Il disegno sperimentale era il seguente: il BAC 803 porta l’inserzione del scFv diretto contro il recettore HER2 all’N terminale della glicoproteina gH, la proteina marker fluorescente mCherry nella regione intergenica U_L37-U_L38 e le sequenze BAC tra U_L3 ed U_L4 (Fig. 4.1.1 A). Il BAC 809 è caratterizzato dalla delezione degli aa 6-38 della glicoproteina gD, regione essenziale per l’interazione della glicoproteina D con i recettori naturali di HSV-1, nectina1 e HVEM. Le altre modificazioni genetiche sono

identiche a quelle presenti nel BAC 803 (Fig. 4.1.1 A). Per un riepilogo della nomenclatura e delle proprietà dei virus descritti in questa sezione si fa riferimento alla tabella 4.1. Per ricostituire i virus, il DNA BAC di 803 o di 809 è stato trasfettato in cellule SK-OV-3, una linea cellulare HER2 positiva derivata dal carcinoma ovarico umano e resistente al trattamento col trastuzumab (nome commerciale Herceptin). In queste condizioni, il DNA BAC trasfettato da origine ai virioni. I virus ricombinanti R-803 ed R-809 così generati, sono stati coltivati e titolati nella medesima linea cellulare. L'espressione corretta della chimera gH-scFv è stata verificata tramite sequenziamento dell'intera ORF della glicoproteina e per mezzo dell'immunorivelazione di lisati proteici di cellule Vero (cellule renali di cercopiteco verde) infettate con i virus R-803, R-809 e R-LM5. Quest'ultimo è essenzialmente un virus *wt* di HSV-1 ceppo F: ha le stesse sequenze BAC presenti in R-803 ed R-809 tra U_L3 ed U_L4, come gene reporter ha l'eGFP (*enhanced green fluorescence protein*) inserito nelle sequenze BAC e il resto della sequenza è *wt*. Per l'immunorivelazione, lisati di cellule Vero infettate con i virus sopracitati sono stati sottoposti a SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) e le glicoproteine di membrane sono state rivelate con un anticorpo policlonale diretto contro gH. Come mostrato in Fig. 4.1.1 B, la proteina chimerica gH-scFv-HER2 (in figura gH_{HER2}) migra ad una velocità elettroforetica minore rispetto alla gH *wt* espressa dal virus R-LM5.

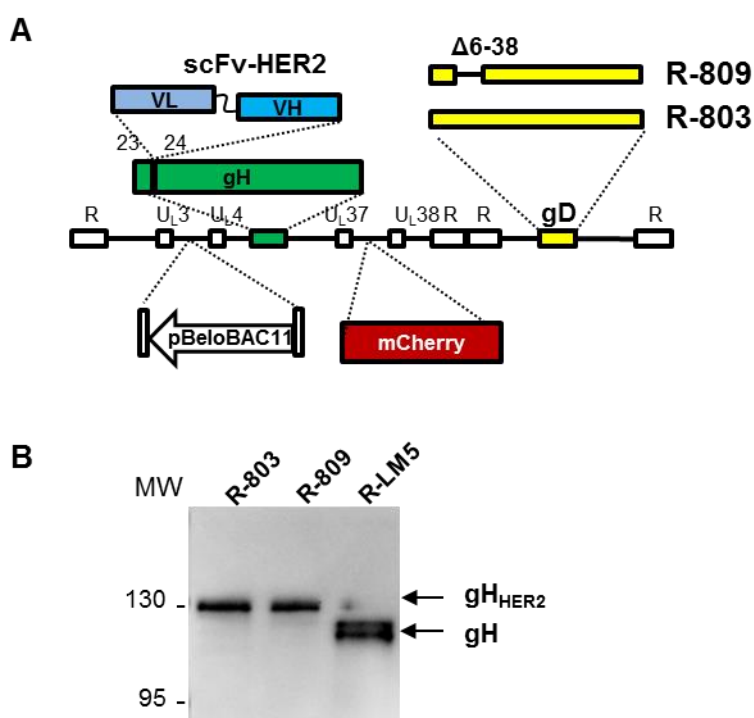


Fig. 4.1.1 – Rappresentazione schematica dei genomi di R-803 ed R-809 ed espressione della chimera gH_{HER2}.
A) Riproduzione schematica dei genomi di R-803 ed R-809. Il scFv-HER2, nel quale si possono distinguere la regione variabile leggera VL e quella pesante VH, è inserito tra gli aa 23 e 24 della gH, le sequenze BAC pBeloBAC11 tra U_L3 ed U_L4 e la sequenza che codifica per la proteina marker fluorescente mCherry è inserita tra le regioni intergeniche U_L37 e U_L38. La sequenza della gD è *wt* in R-803 e deleta degli aa 6-38 in R-809. B)

Immunorivelazione della proteina chimerica gH_{HER2}. R-803 ed R-809 esprimono la glicoproteina chimerica gH-scFv. Lisati di cellule Vero infettate con R-803, R-809 e, per confronto, con R-LM5 sono stati sottoposti a SDS-PAGE e immunorivelazione. I numeri sulla sinistra indicano il peso molecolare del marker, espresso in kilodalton (kDa).

Tabella 4.1 – Modificazioni genotipiche e tropismo dei virus impiegati in questa sezione.

Virus	gD	gH	gB	Reindirizzamento verso HER2	De-indirizzamento da nectina1/HVEM
R-803	wt	scFv-HER2	wt	+	-
R-809	Δ6-38	scFv-HER2	wt	+	+
R-LM113	scFv-HER2 in Δ6-38	wt	wt	+	+
R-LM5	wt	wt	wt	-	-

4.1.2 R-803 ed R-809 sono reindirizzati a cellule che esprimono HER2

Le modifiche al tropismo cellulare sono state analizzate in cellule J che esprimono i transgeni per i recettori HVEM, nectina1 o HER2. La linea cellulare parentale J è negativa per i recettori di HSV-1, per cui non si infetta con un virus *wt* (152). Le cellule sono state esposte ai virus R-803, R-809 e, per confronto, al *wt* R-LM5 e sono state osservate al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione. La Fig. 4.1.2 mostra che i virus R-803 ed R-809 sono in grado di infettare le cellule J-HER2, dimostrando in questo modo di essere efficacemente reindirizzati al recettore HER2. R-803 infetta anche le cellule J-nectina1 e J-HVEM poiché esprime una gD *wt*. Per contro, R-809 non è più in grado di infettare attraverso i recettori naturali di gD, conseguenza della delezione degli aa 6-38 in gD. Come atteso, il virus *wt* R-LM5 infetta le cellule che esprimono i recettori di HSV-1 (nectina1 e HVEM) e non infetta le J-HER2.

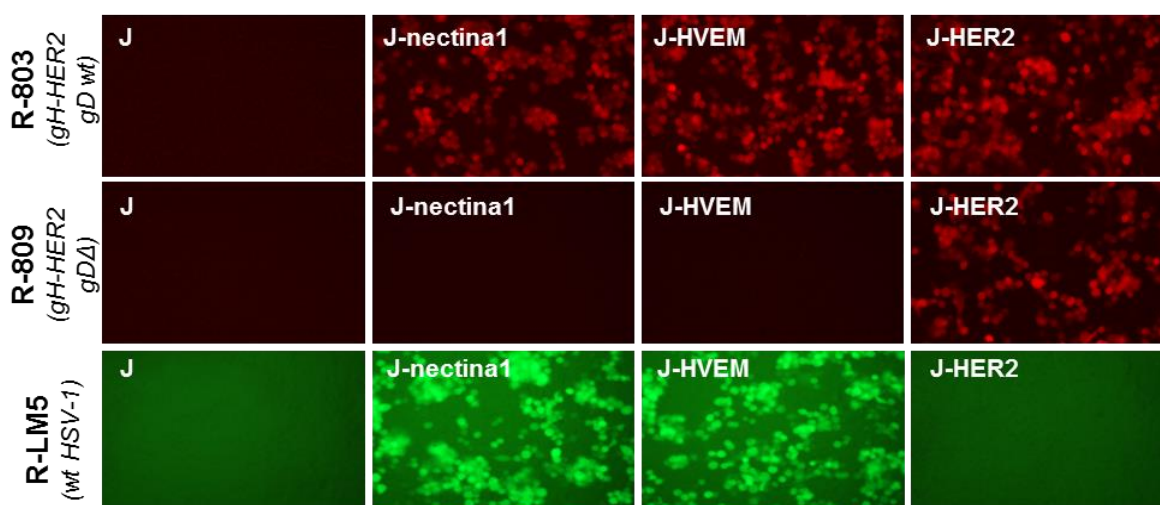


Fig. 4.1.2 – R-809 ed R-803 infettano cellule che esprimono HER2. Le cellule J non esprimono sulla propria superficie i recettori naturali per l'HSV-1 e non si infettano con un virus *wt*, qui esemplificato da R-LM5. Le cellule

J-HER2, J-nectina1 e J-HVEM esprimono i recettori indicati. Sia il virus R-809, che porta la delezione degli aa 6-38 in gD, che il virus R-803 che esprime una gD *wt*, infettano cellule che esprimono HER2 come unico recettore (cellule J-HER2). R-803 infetta anche le J-HVEM e le J-nectina1, come il virus *wt* R-LM5, poiché codifica per una gD *wt*. In tutti i pannelli, le cellule indicate sono state infettate a 3 PFU/cellula e l'infezione è stata monitorata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

Due conclusioni possono essere tratte da questa prima serie di risultati. Lo spettro d'ospite di HSV-1 può essere modificato ingegnerizzando un ligando eterologo in gH, e quindi non solo in gD o gC. In secondo luogo, l'infezione con un virus HSV-1 reindirizzato tramite gH può avere luogo anche in assenza dei recettori di gD. In queste condizioni, gD è fisicamente presente, ma poiché è deleta nei residui coinvolti col legame al recettore, non può più legare i recettori (HVEM e nectina1) e di conseguenza non può trasmettere il segnale di attivazione alle glicoproteine a valle gH/gL e gB.

4.1.3 R-809 infetta efficientemente cellule umane HER2 positive

Una proprietà fondamentale per un agente oncolitico virale è la specificità per le cellule tumorali. Abbiamo quindi voluto ampliare il pannello di cellule HER2 positive e negative su cui valutare l'infezione del virus ricombinante reindirizzato R-809. In particolare cellule umane tumorali HER2 positive come le SK-OV-3 (carcinoma ovarico), BT-474, MDA-MB-453, SK-BR-3 (tre linee di adenocarcinoma mammario) e HER2 negative come le HeLa (cancro della cervice uterina), SK-N-SH (neuroblastoma) e cellule non tumorali HFF14 (fibroblasti), HaCaT (cheratinociti), sono state infettate con il virus ricombinante R-809. Il virus R-803 non de-reindirizzato, e il virus R-LM113 reindirizzato a HER2 tramite gD, sono stati inclusi nell'esperimento come controlli. I risultati riportati in Fig. 4.1.3 mostrano che R-809 infetta le cellule HER2 positive (panello B), ma non è in grado di infettare le cellule HER2 negative (panello A). R-803 infetta le cellule HER2 negative (panello A) tramite gD *wt*, e il ricombinante R-LM113 infetta, le linee HER2 positive (panello B), come atteso. Questo risultato rafforza la conclusione che R-809 è reindirizzato verso HER2 *via* gH e de-reindirizzato dai recettori naturali di gD e anticipa per questo potenziale agente oncolitico un profilo di sicurezza elevato.

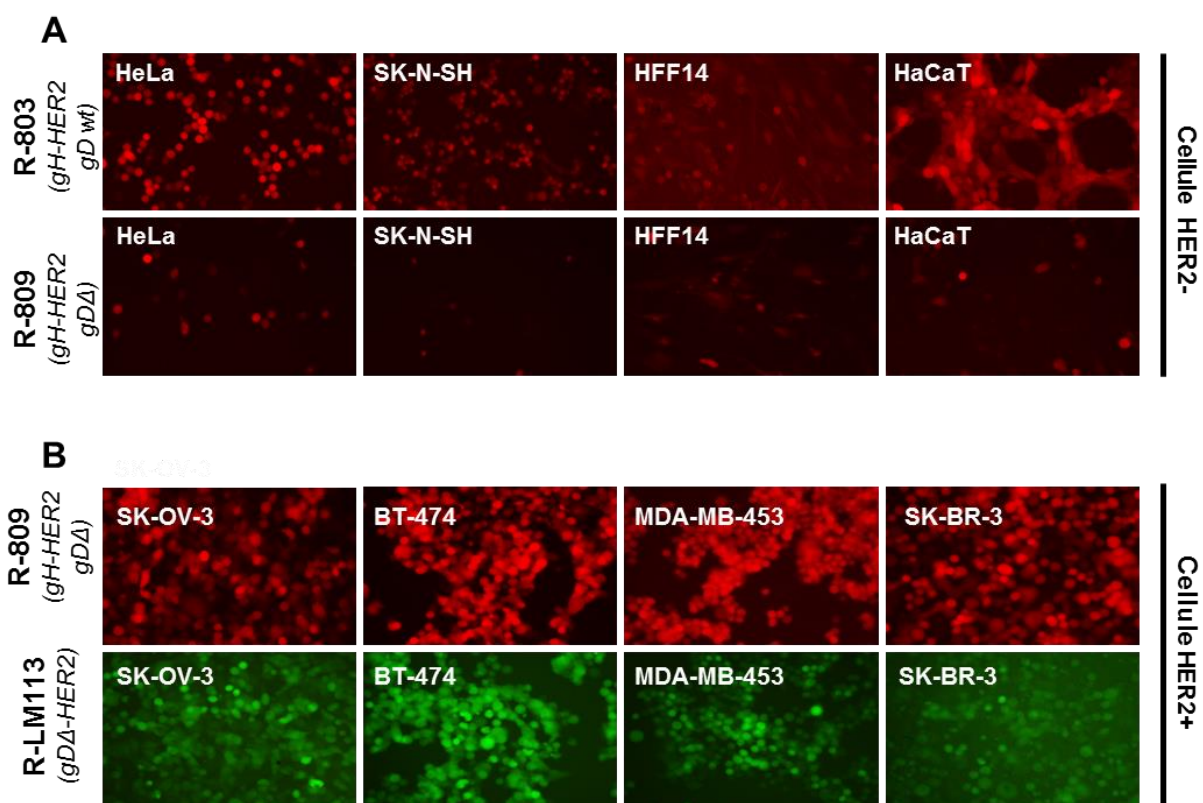


Fig. 4.1.3 – R-809 infetta specificatamente cellule umane HER2 positive. A-B) R-809, ma non R-803, infetta specificatamente cellule umane HER2 positive. Il virus R-LM113, che ha l'inserzione del scFv diretto contro l'HER2 nella gD deleta degli aa 6-38, è stato incluso come controllo positivo di un virus reindirizzato verso HER2. In tutti i pannelli, le cellule indicate sono state infettate a 3 PFU/cellula e l'infezione è stata monitorata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

4.1.4 R-803 ed R-809 utilizzano HER2 come recettore per l'ingresso nelle cellule

Per avere ulteriore conferma dell'utilizzo del recettore HER2 durante l'ingresso dei virus ricombinanti R-803 ed R-809, abbiamo infettato cellule J-HER2 in presenza di trastuzumab, l'anticorpo monoclonale (MAb) dal quale è stato derivato il scFv-HER2 inserito nel virus, o di IgG murine di controllo. L'infezione è stata fotografata dopo 24 ore e quantificata al citofluorimetro. Come risulta evidente dalla Fig. 4.1.4 l'infezione dei virus R-803 (panello A) ed R-809 (panello B) viene inibita dal trastuzumab, fornendo prova ulteriore che entrambi i virus utilizzano HER2 per entrare nelle cellule J-HER2.

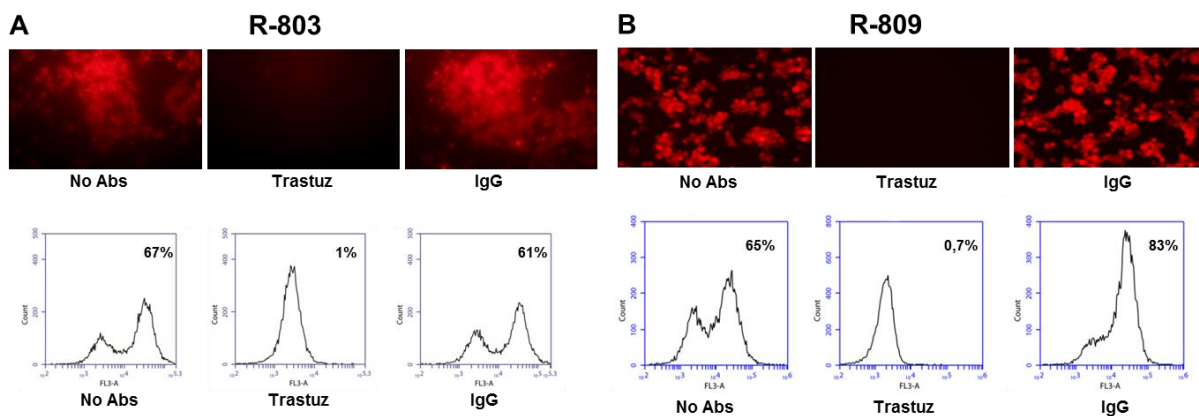


Fig. 4.1.4 – Il MAb trastuzumab inibisce l’infezione dei virus ricombinanti R-803 ed R-809 in cellule J-HER2.
A-B) Cellule J-HER2 sono state infettate con R-803 o R-809 ad una MOI di 3 PFU/cellula in presenza del MAb trastuzumab diretto contro l’HER2 o in presenza di IgG murine di controllo (28µg/ml, concentrazione finale). L’infezione è fotografata a 24 ore dall’infezione al microscopio a fluorescenza e quantificata per mezzo del citofluorimetro. I picchi relativi alla quantificazione col citofluorimetro sono mostrati nei pannelli in basso.

Abbiamo proseguito la caratterizzazione sull’utilizzo dei recettori da parte dei virus ricombinanti R-803 ed R-809 in cellule SK-OV-3 che esprimono sia i recettori naturali di HSV-1 (nectina1 e HVEM) sia il recettore tumorale HER2. Il quesito a cui rispondere era se un recettore fosse utilizzato in modo preferenziale sull’altro, o se l’utilizzo fosse alternativo. In quest’ultimo caso, un blocco all’accesso ad uno dei due set di recettori (nectina1/HVEM oppure HER2), sarebbe risultato in una inibizione trascurabile dell’infezione, mentre il blocco simultaneo dei due set di recettori avrebbe avuto come effetto una forte inibizione dell’infezione. Come controlli, abbiamo incluso il virus R-LM113 reindirizzato verso HER2 tramite gD ed il *wt* R-LM5. Cellule SK-OV-3 sono state infettate con i virus indicati in Fig. 4.1.5, in presenza del MAb 52S (diretto contro gH), il MAb trastuzumab (diretto contro l’HER2), il MAb neutralizzante HD1 (diretto contro gD) o in presenza di una combinazione dei due anticorpi. Come risulta evidente dalla Fig. 4.1.5 il trattamento singolo con il trastuzumab o con l’HD1 non ha nessun effetto sull’infezione del virus R-803, ma il trattamento combinato HD1 + trastuzumab neutralizza totalmente l’infezione. Si può concludere quindi, che R-803 è in grado di utilizzare alternativamente HER2 (tramite il scFv ingegnerizzato nella gH) e nectina1/HVEM (per mezzo della gD *wt*) per infettare le SK-OV-3. Come atteso, l’infezione dei virus ricombinanti che portano la delezione 6-38 nella gD e il scFv-HER2 nella gH (R-809) o gD (R-LM113) è inibita dal trattamento singolo col trastuzumab. Il pre-trattamento delle cellule con il MAb 52S diretto contro gH inibisce l’infezione di tutti i virus saggati. Questo anticorpo riconosce un epitopo continuo, indipendente da gL, con residui critici che mappano negli aa S536 e A537. L’infezione dei virus ricombinanti R-803 ed R-809 in SK-OV-3 è abolita in presenza del MAb 52S, indicando che il dominio funzionale di gH *wt* riconosciuto da questo anticorpo è preservato nella chimera scFv-gH.

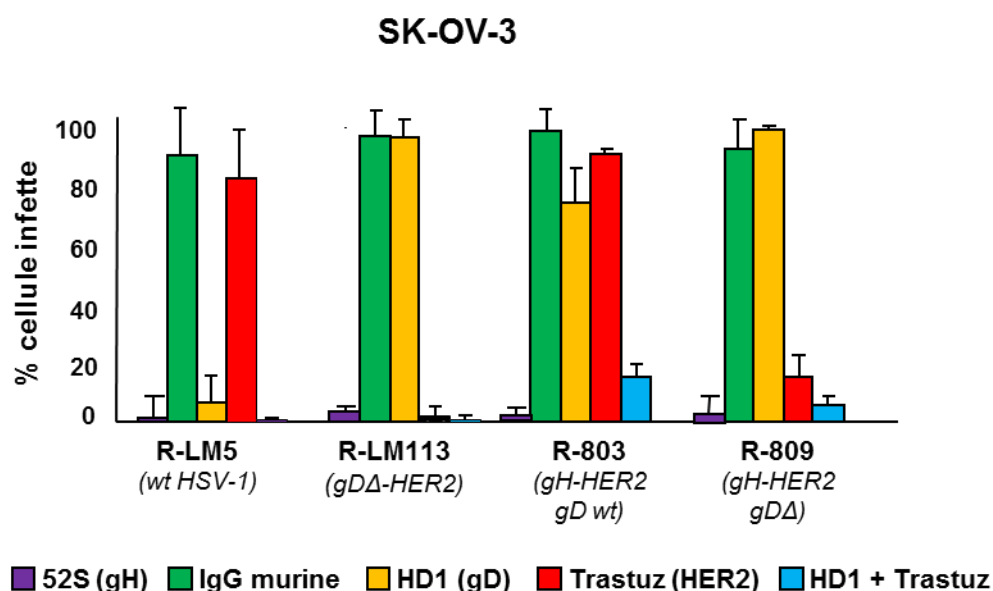


Fig. 4.1.5 – Utilizzo dei diversi recettori da parte di R-803 ed R-809 in cellule SK-OV-3. I virus indicati in figura sono stati pre-incubati per 1 ora con il MAb HD1 (1.5 µg/ml, concentrazione finale) o con il 52S (fluido di ascite diluito 1:25) e successivamente utilizzati per infettare cellule SK-OV-3 ad una MOI di 3 PFU/cellula. Dove indicato, le cellule sono state pre-trattate per 1 ora con il MAb trastuzumab o con le IgG murine di controllo (28µg/ml, concentrazione finale). E' stato incluso anche il trattamento combinato dell'HD1+ trastuzumab. Il livello d'infezione è stato quantificato 24 ore dopo per mezzo del citofluorimetro ed espresso in rapporto alle cellule infette con virus/cellule non trattati. Il valore di ogni colonna rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti ± S.D. Accanto agli anticorpi utilizzati, in parentesi è indicato il bersaglio contro cui questi anticorpi sono diretti.

4.1.5 Replicazione e citotossicità dei virus ricombinanti R-803 ed R-809

Un'efficiente replicazione e citotossicità cellulare sono caratteristiche fondamentali per un candidato HSV-1 oncolitico. Per analizzare le caratteristiche di crescita dei virus ricombinanti *in vitro*, cellule tumorali HER2 positive SK-OV-3 sono state seminate in piastre repliche e infettate con i virus R-803, R-809 e per confronto con il virus reindirizzato verso HER2 tramite gD R-LM113 e con il virus *wt* R-LM5. Le piastre replica sono state congelate a 3, 24, or 48 ore dall'infezione e la progenie virale (cellule infette e surnatante) è stata titolata in cellule SK-OV-3. I risultati riportati in Fig. 4.1.6 A mostrano che i virus ricombinanti R-803 ed R-809 replicano egualmente bene in SK-OV-3 e non si differenziano dal *wt* R-LM5 e dal virus reindirizzato in gD, R-LM113.

Infine, abbiamo analizzato l'efficacia oncolitica *in vitro* dei virus R-803, R-809 sulla linea SK-OV-3. Repliche di colture di cellule SKO-OV-3 sono state infettate con i virus indicati e al tempo indicato, è stata aggiunta al terreno la soluzione alamarBlue, che viene ridotta solo da cellule metabolicamente attive. Dopo 4 ore di incubazione a 37° C si è proceduti alla lettura

dell'assorbanza a 560 e 600 nm con il lettore di piastre. Per ogni tempo, la vitalità cellulare è stata espressa come percentuale di riduzione dell'AlamarBlue in cellule infette rispetto a cellule non infette, sottraendo nei calcoli il contributo del solo terreno. La citotossicità indotta dai virus R-803, R-809 ed R-LM113 si è dimostrata molto simile, e maggiore di quella indotta dal virus R-LM5 in una linea tumorale che iper-esprime il recettore tumorale HER2 (Fig. 4.1.6 B).

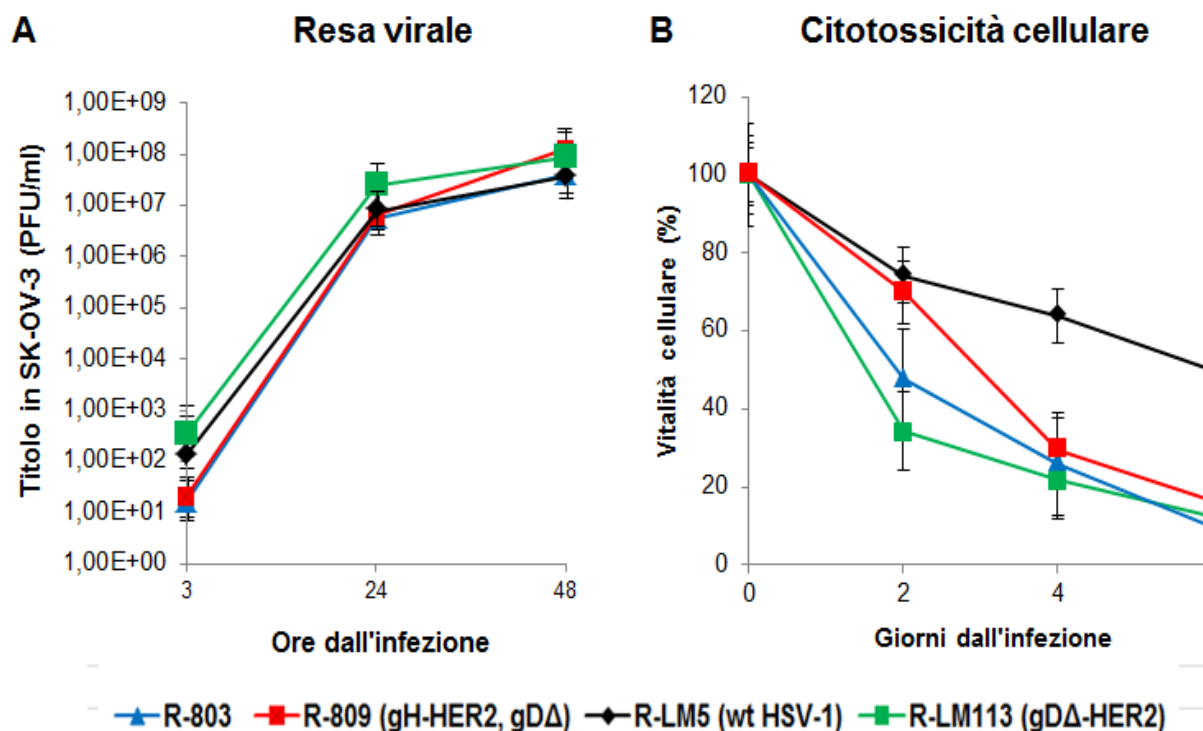


Fig. 4.1.6 – A-B) Capacità replicativa e citotossicità dei virus R-803 ed R-809 in cellule SK-OV-3. A) Curve di crescita dei virus indicati in cellule SK-OV-3. Piastre repliche di cellule SK-OV-3 sono state infettate con i virus R-803, R-809, R-LM5 ed R-LM113 ad una MOI di 0,1 PFU/cellula. La progenie virale prodotta è stata titolata in SK-OV-3. I risultati sono medie di due esperimenti indipendenti \pm S.D. B) Citotossicità cellulare dei virus reindirizzati in gH. Per l'esperimento di citotossicità cellulare, piastre repliche di cellule SK-OV-3 sono state infettate con i virus indicati ad una MOI di 2 PFU/cellula. La vitalità cellulare è stata determinata col saggio AlamarBlue. Ogni valore rappresenta la media di triplicati \pm S.D.

4.2 Reindirizzamento simultaneo di HSV-1 verso due recettori distinti

Le terapie oncologiche mirate, dirette contro un unico bersaglio molecolare, possono essere più efficaci rispetto ad altri tipi di trattamento e meno dannose per le cellule sane perché non provocano gli effetti collaterali della terapia antitumorale tradizionale. Fanno parte della categoria delle terapie oncologiche mirate gli anticorpi monoclonali trastuzumab ed erbitux che hanno come bersaglio molecolare rispettivamente il recettore HER2 ed EGFR. Tuttavia, molte terapie anticancro dirette contro un unico bersaglio e che inizialmente risultano efficaci, perdono efficacia nel tempo a causa di una resistenza acquisita durante il trattamento (128). Un altro punto a sfavore dell'approccio mirato è che non prende in considerazione l'eterogeneità intrinseca dei tumori. Optare per una terapia che abbia molteplici bersagli molecolari potrebbe aiutare a superare questi limiti.

Finora, la glicoproteina gD è stata l'unica proteina che ha permesso di reindirizzare con successo il tropismo di HSV-1 (51, 94). I dati presentati in questa tesi e pubblicati nel lavoro di Gatta (164), dimostrano che anche gH accetta l'inserzione di un ligando eterologo (nel nostro caso un scFv-HER2) e diventa uno strumento per reindirizzare HSV-1 verso un recettore eterologo (il recettore HER2). Obiettivo successivo è stato combinare le modifiche in gD con quelle in gH al fine di ottenere un HSV-1 oncolitico efficace e sicuro diretto simultaneamente contro due recettori tumorali, HER2 ed EGFR.

4.2.1 Costruzione e specificità del virus reindirizzato simultaneamente verso i recettori EGFR ed HER2

Il virus ricombinante R-805 è stato ottenuto col metodo di ricombinazione galK, attraverso un intermedio di ricombinazione utilizzato anche per generare R-809 (si rimanda alla Fig. 3.9 nella sezione dei materiali e metodi). Il BAC 805 porta l'inserzione del scFv diretto contro il recettore HER2 nella porzione N-terminale della glicoproteina gH (stessa posizione del virus R-809), la proteina marker fluorescente mCherry nella regione intergenica UL37-UL38 e le sequenze BAC tra U_L3 ed U_L4. Il BAC 805, in aggiunta al BAC 809, presenta anche l'inserzione del scFv diretto contro EGFR nella delezione 6-38 della glicoproteina gD, regione critica per il legame ai recettori naturali di HSV-1 (Fig. 4.2.1). Per un riepilogo della nomenclatura e delle proprietà dei virus descritti in questa sezione si fa riferimento alla tabella 4.2. Per rigenerare il virus, il DNA BAC 805 è stato trasfettato in cellule SK-OV-3. R-805 è stato successivamente amplificato e titolato nella medesima linea. La presenza degli inserti scFv-HER2 e scFv-EGFR è stata verificata tramite sequenziamento dell'intera ORF della glicoproteina H e D.

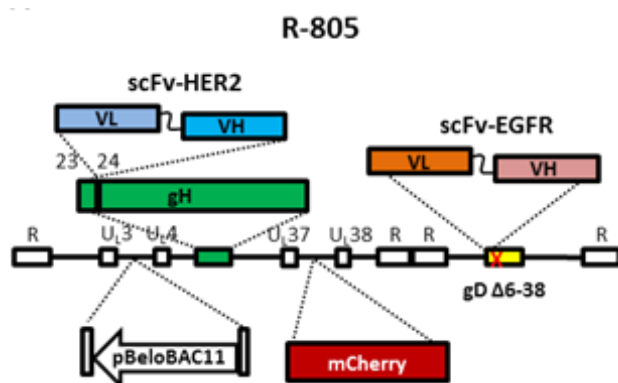


Fig. 4.2.1 – Rappresentazione schematica del genoma del virus ricombinante R-805. Il scFv-HER2, è inserito tra gli aa 23 e 24 di gH, mentre il scFv-EGFR è inserito nella delezione degli aa 6-38 di gD. Per entrambi i scFv si possono distinguere la regione variabile leggera VL e quella pesante VH. In figura, sono mostrate le sequenze BAC pBeloBAC11 tra U_L3 ed U_L4 e la sequenza che codifica per la proteina marker fluorescente mCherry inserita tra le regioni intergeniche U_L37 e U_L38 .

Tabella 4.2 – Modificazioni genotipiche e tropismo dei virus impiegati in questa sezione.

Virus	gD	gH	gB	Reindirizzamento verso HER2	Reindirizzamento verso EGFR	De-indirizzamento da nectina1/HVEM
R-805	scFv-EGFR in $\Delta 6-38$	scFv-HER2	wt	+	+	+
R-809	$\Delta 6-38$	scFv-HER2	wt	+	-	+
R-LM113	scFv-HER2 in $\Delta 6-38$	wt	wt	+	-	+
R-LM611	scFv-EGFR in $\Delta 6-38$	wt	wt	-	+	+
R-LM5	wt	wt	wt	-	-	-

Per verificare l'impiego simultaneo dei due recettori da parte del virus bispecifico R-805, abbiamo utilizzato il pannello delle cellule J transgeniche esprimenti i recettori naturali di HSV-1 (nectina1 o HVEM) o i recettori di nostro interesse, HER2 o EGFR. Ogni linea cellulare è stata infettata con il ricombinante doppio-reindirizzato R-805, con il singolo HER2-reindirizzato R-809, con il singolo EGFR-reindirizzato R-LM611 o con un virus *wt*, R-LM5. L'infezione è stata osservata e fotografata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione. Il risultato riportato in Fig. 4.2.2 mostra che R-805 ed R-809 infettano le cellule J-HER2 grazie al scFv-HER2 ingegnerizzato nella glicoproteina gH. R-805 ha acquisito inoltre la capacità di infettare le cellule J-EGFR per via dell'inserzione del scFv-EGFR nella delezione 6-38 di gD. Il virus *wt* R-LM5 infetta solo le cellule che esprimono i recettori naturali di HSV-1, nectina1 o HVEM. Il virus R-LM611 porta l'inserzione dello stesso scFv-EGFR presente in R-805 ed è stato incluso

come controllo positivo di un virus reindirizzato solo verso l'EGFR; infetta le cellule J-EGFR. Tutti i virus ricombinanti sono de-reindirizzati dai recettori naturali di HSV-1 a seguito della delezione della regione 6-38 di gD, critica per il legame ai recettori naturali. Questo primo dato conferma la specificità del virus reindirizzato contemporaneamente ai recettori HER2 ed EGFR.

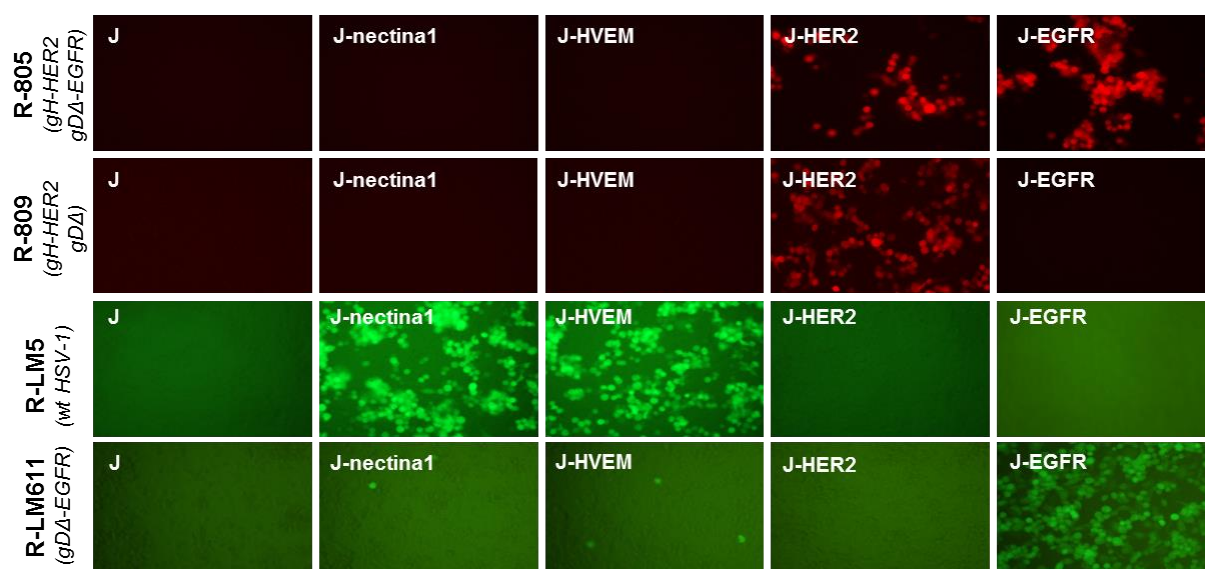


Fig. 4.2.2 – R-805 è in grado di infettare simultaneamente cellule J che esprimono il recettore EGFR o l'HER2. Le cellule J non esprimono sulla propria superficie i recettori naturali per l'HSV-1 (nectina1 e HVEM) e non si infettano con un virus wt, qui esemplificato dal virus R-LM5. Le cellule J-HER2, J-EGFR, J-nectina1 e J-HVEM esprimono solo i recettori indicati. R-805 ed R-809 infettano le J-HER2 grazie al scFv-HER2 ingegnerizzato in gH. R-805 ha acquisito inoltre la capacità di infettare le J-EGFR per via dell'inserzione del scFv-EGFR nella delezione 6-38 di gD. Il virus wt R-LM5 infetta solo le cellule che esprimono i recettori naturali di HSV-1, nectina1 e HVEM. Il virus R-LM611 porta l'inserzione dello stesso scFv-EGFR presente in R-805 ed è stato incluso come controllo positivo di un virus reindirizzato verso EGFR. Tutti i virus ricombinanti sono de-reindirizzati dai recettori naturali di HSV-1 a seguito della delezione della regione 6-38 di gD, critica per il legame ai recettori. In tutti i pannelli, le cellule indicate sono state infettate a 3 PFU/cellula e l'infezione è stata monitorata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

4.2.2 R-805 infetta e uccide efficacemente le linee tumorali umane positive per HER2 ed EGFR

Per studiare l'infezione di R-805 in linee umane tumorali, abbiamo impiegato un pannello di linee tumorali che esprimono sulla propria superficie i recettori HER2 ed EGFR a diversi livelli di espressione. Il livello di espressione di EGFR ed HER2, quantificato al citofluorimetro, è riportato in Fig. 4.2.3 A. Le medesime linee cellulari sono state infettate con una stessa quantità del virus ricombinante bispecifico R-805 e, per confronto, con il virus R-LM611 EGFR-

reindirizzato ed R-809 HER2-reindirizzato. L'infezione è stata valutata al microscopio a fluorescenza 24 ore dall'infezione. Come risulta evidente dal pannello B della Fig. 4.2.3 il virus bispecifico R-805 è in grado di infettare tutte le linee cellulari esaminate, contrariamente a R-LM611 ed R-809, reindirizzati verso un unico bersaglio.

In particolare, la linea di carcinoma epidermoide A431, che esprime EGFR al livello più elevato e di cui invece solo il 65,8 % è debolmente positivo per l'HER2, si infetta efficacemente con il virus bispecifico R-805 e con il singolo-reindirizzato verso l'EGFR R-LM611. L'infezione con il singolo-reindirizzato verso l'HER2 (R-809) non produce placche, ma solo singole cellule infette. La linea di adenocarcinoma mammario MDA-MB-231, che esprime alti livelli di EGFR ed è negativa per HER2 (solo il 12,2 % delle cellule esprime HER2 a minimi livelli; di fatti in letteratura sono descritte come cellule HER2-negative (165)) mostra un pattern d'infezione analogo a quello delle cellule A431 e si infetta mediante EGFR.

La linea di adenocarcinoma ovarico SK-OV-3, che esprime entrambi i recettori, si infetta efficacemente con tutti i virus esaminati. La linea di carcinoma mammario metastatico MDA-MB-453 (sito di effusione pleurale), che esprime alti livelli di HER2 ed è negativa per EGFR, si infetta, come atteso, solo con i virus reindirizzati verso HER2, R-809 ed R-805. R-LM611, reindirizzato solo sul recettore EGFR, non è in grado di infettare le cellule MDA-MB-453. La linea di carcinoma colon-rettale HT-29 presenta bassi livelli di entrambi i recettori. Il razionale per cui questa linea è stata inizialmente inclusa nello studio è che un basso livello EGFR ed HER2 avrebbe rivelato un chiaro vantaggio (un azione "additiva") del virus bispecifico rispetto ai virus reindirizzati solamente contro uno dei due recettori. Come risulta invece dalla Fig. 4.2.3 B, sia il virus bispecifico R-805, che il virus R-LM611 infettano efficacemente le cellule HT-29, suggerendo che il livello di espressione del recettore EGFR sia sufficiente per mediare un'efficiente infezione. Questo discorso non sembra valere per il recettore HER2, in quanto il virus reindirizzato solamente al recettore HER2, R-809, non è in grado di infettare le HT-29, sebbene queste siano positive, seppure in maniera minore rispetto alle SK-OV-3 e MDA-MB-453.

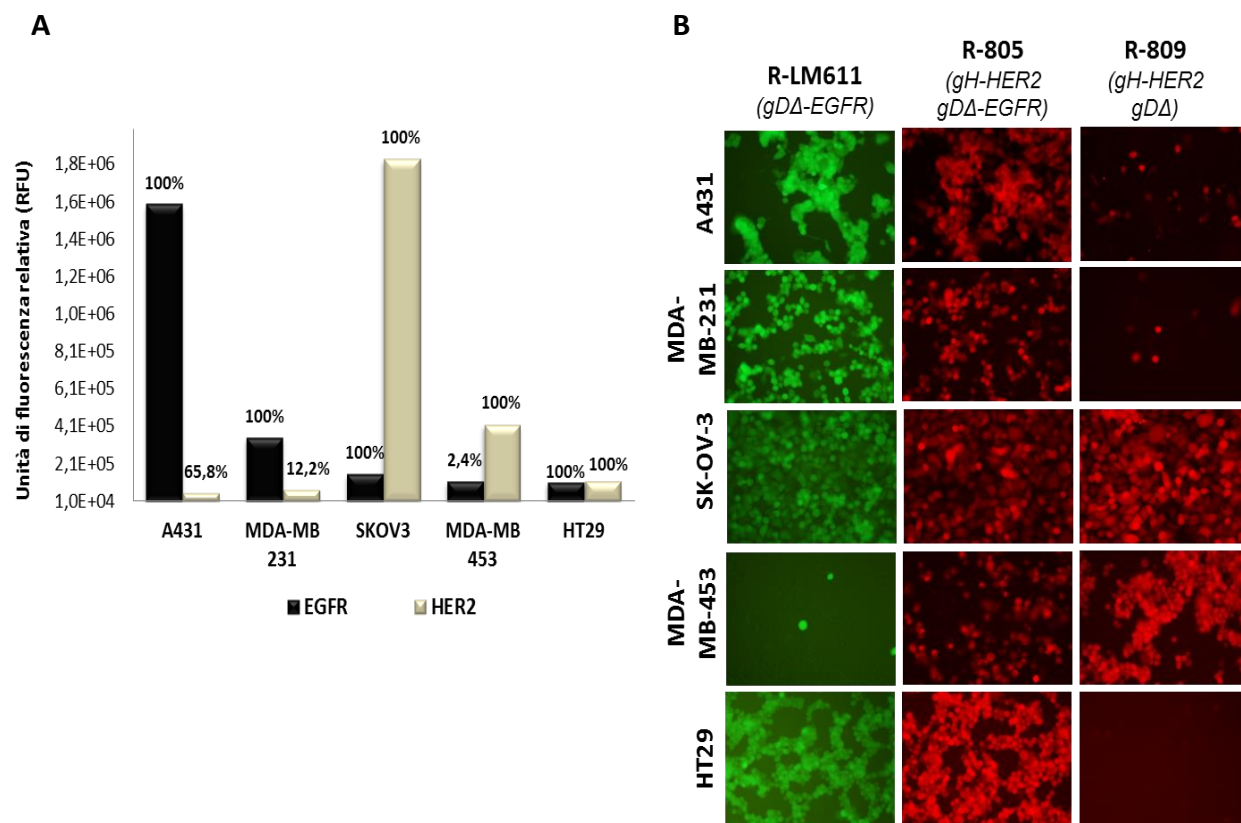
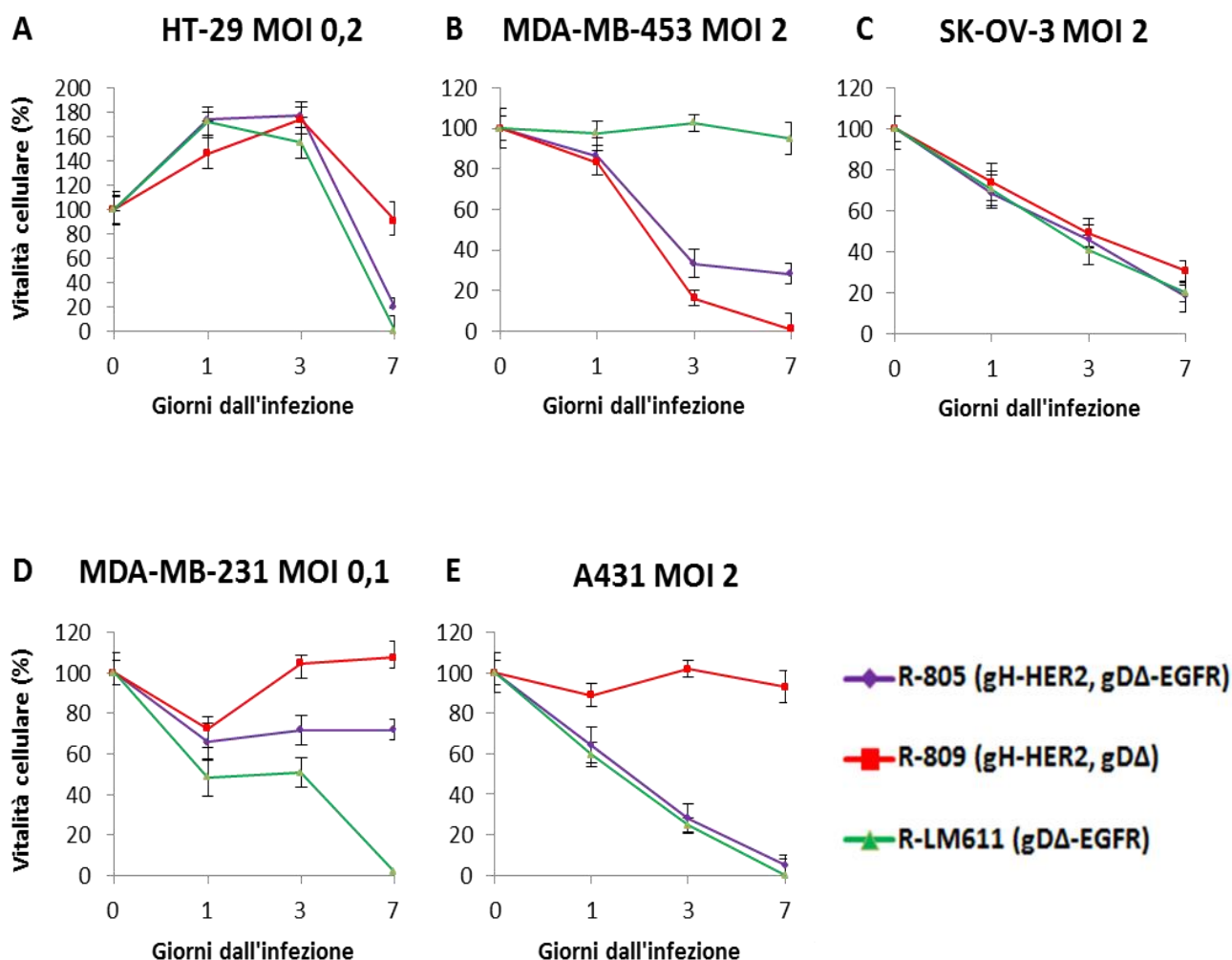


Fig. 4.2.3 – Il virus bispecifico R-805 infetta efficacemente cellule che esprimono il recettore HER2 o EGFR.

A) Livelli di espressione dei recettori EGFR ed HER2. L'espressione dei recettori EGFR ed HER2 è stata quantificata al citofluorimetro: il valore della colonna indica il valore dell'unità di fluorescenza relativa, indice della densità del recettore presente sulla superficie cellulare, mentre i numeri sopra ogni colonna indicano la percentuale di cellule positive per il recettore. B) Pattern d'infezione dei virus ricombinanti. Il virus R-LM611 reindirizzato verso EGFR non è in grado di infettare la linea EGFR-negativa MDA-MB-453. Il virus R-809 diretto contro HER2 non è in grado di formare placche in linee che esprimono HER2 a bassi livelli, le cellule A431, le MDA-MB-231 e HT-29. In entrambi i casi il virus bispecifico R-805 infetta efficacemente tutte le linee cellulari testate. Le SK-OV-3 che esprimono entrambi i tipi di recettori si infettano con tutti i virus ricombinanti a cui sono state esposte. Per l'esperimento, le cellule indicate sono state infettate a 3 PFU/cellula e l'infezione è stata monitorata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

Abbiamo proseguito il nostro studio sul virus bispecifico R-805, valutandone l'efficacia oncolitica *in vitro*. Le stesse linee cellulari utilizzate negli esperimenti mostrati in Fig. 4.2.3 sono state infettate con il virus bispecifico R-805, e con i virus reindirizzati contro EGFR (R-LM611) ed HER2 (R-809). Questa volta la MOI con cui sono state infettate le cellule non è uniformata sul titolo in SK-OV-3, ma ciascun virus è stato titolato nella rispettiva linea impiegata per la valutazione citolitica. In questo modo si tiene conto della diversa efficienza dell'infezione dovuta ad una differente permissività/suscettibilità intrinseca alla linea cellulare. La vitalità cellulare, misurata con il metodo alamarBlue, è stata valutata a uno, tre e sette giorni dall'infezione. La

citotossicità del virus bispecifico R-805 e del EGFR-reindirizzato R-LM611 nella linea HT-29 è del 100% a sette giorni, mentre il virus HER2-reindirizzato R-809 non è citotossico in questa linea, in quanto la curva della vitalità si arresta ad un 90% (Fig. 4.2.4 A). La linea MB-453 rivela un rapido declino della vitalità già a 3 giorni dall'infezione con i virus R-805 ed R-809. Il virus R-LM611 non causa citotossicità in questa linea (Fig. 4.2.4 B). L'infezione delle cellule SK-OV-3 con tutti e tre i virus saggiati determina una riduzione della vitalità cellulare che si arresta a circa 20% a 7 giorni (Fig. 4.2.4 C). La citotossicità dei virus R-805 ed R-LM611 nella linea MDA-MB-231 è del 30% e 100%, rispettivamente. Il virus R-809 non ha alcun effetto citotossico su questa linea (Fig. 4.2.4 D). Nella linea A431 l'efficacia oncolitica dei virus R-805 ed R-LM611 è massima al settimo giorno. Il virus R-809 non causa citotossicità in questa linea (Fig. 4.2.4 E). Nell'insieme, i dati ottenuti dall'analisi della citotossicità cellulare sono in accordo con il pattern d'infezione osservato negli esperimenti preliminari d'infezione e dimostrano l'efficacia oncolitica del virus R-805 *in vitro*.



4.2.4 Efficacia oncolitica *in vitro* del virus bispecifico R-805. Linee umane di carcinoma del colon-retto HT-29 (pannello A), del carcinoma mammario metastatico MDA-MB-453 (pannello B), del carcinoma ovarico SK-OV-3 (pannello C), del adenocarcinoma mammario MDA-MB-231 (pannello D) e del carcinoma epidermoide A431

(pannello E), sono state infettate alle MOI indicate, con il virus bispecifico R-805 (in viola), con il singolo HER2-reindirizzato R-809 (in rosso) ed il singolo EGFR-reindirizzato R-LM611 (in verde). La vitalità cellulare è stata determinata a 1, 3 e 7 giorni dall'infezione con il metodo alamarBlue. Ogni valore rappresenta la media di triplicati \pm S.D.

4.2.3 Esperimenti di induzione tumorale delle linee MDA-MB-453 ed HT-29 in topi immunodepressi

Tutti gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti nei laboratori del centro GLP della Primm s.r.l di Treviso. Il protocollo sperimentale è stato autorizzato dal Ministero della Salute italiano.

In base ai risultati di efficacia oncolitica *in vitro*, abbiamo scelto le linee tumorali HT-29 ed MDA-MB-453 come modelli di tumore EGFR ed HER2 positivo su cui valutare l'efficacia oncolitica del virus bispecifico R-805 *in vivo*. Prima di andare a valutare l'efficacia anti-tumorale, sono state eseguite prove di induzione tumorale delle linee HT-29 ed MDA-MB-453 per determinare sia la capacità di tali cellule di indurre tumori in topi immunodepressi, che l'andamento della crescita dei noduli tumorali. Essendo i scFv ingegnerizzati nei virus specifici per i recettori HER2/EGFR umani, il nostro modello prevede lo xenotrapianto di tumori umani in topi immunodepressi.

Sono state effettuate due distinte prove di induzione tumorale sottocute (s.c.). Una prova consisteva nell'inoculo di 5×10^6 o 6×10^6 cellule per topo NOD SCID GAMMA (NSG) della linea cellulare MDA-MB-453 risospese in matrigel. I topi NSG sono deficienti per la risposta T, B, NK e per il *signaling* delle citochine. E' stato riportato in diversi lavori che la co-iniezione di componenti della matrice extracellulare contenuti nel matrigel, con cellule umane tumorali in topi immunodepressi, ne facilitasse la formazione neoplastica (166).

La seconda prova consisteva nell'inoculo in CD-1 Nude Mouse di $2,5 \times 10^6$ o 4×10^6 cellule per topo della linea HT-29 diluite in PBS. La scelta di questa specie animale è accettata dalle autorità regolatorie nazionali ed internazionali, vi sono inoltre molti dati di letteratura scientifica che supportano l'utilizzo dei topi CD1-nude, atimici e incapaci di produrre cellule T, per studi di tipo oncologico. Il topo nudo è in grado di ricevere innesti tissutali e tumorali da diverse specie senza che in esso si verifichino reazioni di rigetto.

La crescita della massa tumorale è stata seguita per 4 settimane, mediante misura con calibro millimetrato dal momento della comparsa della massa neoplastica. Le curve di crescita tumorale sono mostrate in Fig. 4.2.5 A-B. Negli animali inoculati con la linea MDA-MB453 non si sono sviluppati noduli tumorali a nessuna concentrazione testata (Fig. 4.2.5 A). Le piccole formazioni tumorali di circa 200 mm^3 , misurate al giorno 31 sono regredite velocemente. Molto probabilmente le cellule non sono riuscite a radicarsi e sono state riassorbite. Molte linee

cellulari, anche se presentano un'elevata invasività *in vitro*, come le MDA-MB-453 che sono state isolate da metastasi al pericardio del cancro mammario, possono non essere in grado di indurre la formazione di tumori quando impiantate in animali da esperimento; le condizioni ambientali dello stroma animale e le interazioni di quest'ultimo con le cellule umane impiantate, infatti, possono influenzare lo sviluppo e la progressione tumorale. Per quanto riguarda le cellule HT-29, i noduli tumorali hanno iniziato a svilupparsi in tutti i topi e con entrambe le dosi saggate al 10° giorno. Il volume medio dei noduli tumorali ha raggiunto al 42° giorno 4000 e 8000 mm³ per la dose di $2,5 \times 10^6$ e 4×10^6 , rispettivamente. In considerazione dei risultati ottenuti, abbiamo condotto i successivi esperimenti di efficacia oncolitica *in vivo* sulla linea HT-29 in topi nudi CD-1 utilizzando la dose di $2,5 \times 10^6$ cellule/topo.

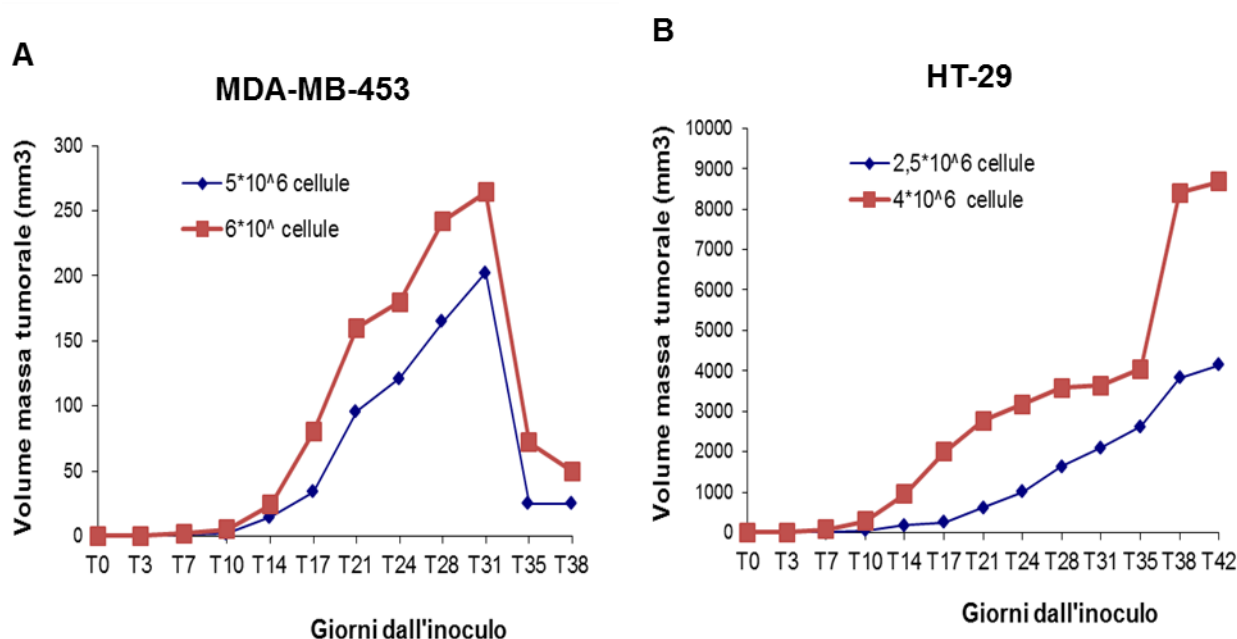


Fig. 4.2.5 – Curve di crescita tumorale delle linee MDA-MB-453 e HT-29 in topi immunodepressi. A) Tumorigenicità della linea MDA-MB-453 in topi NSG. Per l'induzione tumorale con la linea cellulare MDA-MB-453 2 topi NSG (NOD SCID GAMMA) hanno ricevuto per via sottocutanea 5×10^6 cellule e 1 topo 6×10^6 cellule risospese in matrigel. B) Tumorigenicità della linea HT-29 in topi CD-1. Per la sperimentazione che ha riguardato la linea cellulare HT-29, 2 topi nudi CD-1 hanno ricevuto per via sottocutanea $2,5 \times 10^6$ cellule e 1 topo 4×10^6 cellule in PBS apirogeno. La crescita della massa tumorale è stata seguita per 6 settimane, mediante calibro millimetrato dal momento della comparsa della massa neoplastica.

4.2.4 Esperimento di efficacia anti-tumorale del virus oncolitico R-805 sulla linea tumorale umana HT29 in topi atimici CD1 nude

In considerazione dei risultati ottenuti negli esperimenti di induzione tumorale, sono in corso esperimenti di efficacia oncolitica *in vivo* sulla linea HT-29. Venti topi CD-1 sono stati divisi in quattro gruppi, costituiti da cinque animali ciascuno. A tutti gli animali saranno inoculati a livello del fianco $2,5 \times 10^6$ cellule della linea cellulare HT-29 risospese in PBS. A distanza di 5, 15, 25 e 35 giorni dall'inoculo delle cellule, i topi del gruppo di controllo riceveranno in sede intra tumorale 0,2 ml di veicolo (PBS), mentre i topi dei gruppi di trattamento riceveranno 0,2 ml della sospensione virale contenente 2×10^7 PFU dei rispettivi virus oncolitici (Fig.4.2.6). R-805 sarà confrontato con il virus R-809 HER2-reindirizzato ed il virus R-LM611 EGFR-reindirizzato. L'efficacia dei virus oncolitici sarà valutata confrontando le dimensioni delle masse tumorali presenti nei topi dei gruppi di trattamento rispetto a quelle dei topi del gruppo di controllo. La misurazione sarà effettuata mediante calibro millimetrato due volte a settimana.

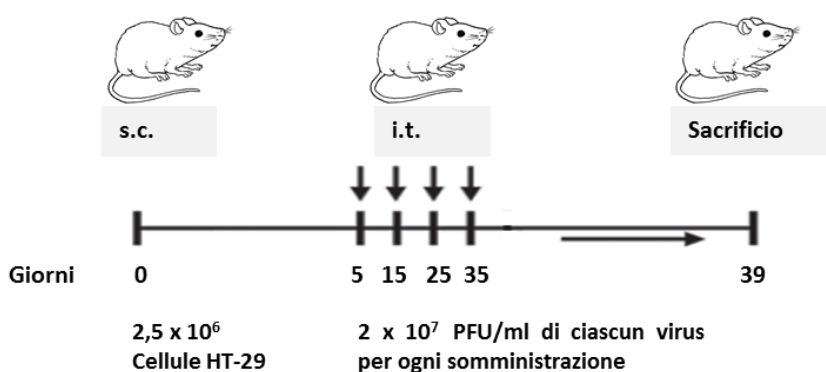


Fig. 4.2.6 – Disegno sperimentale del test di efficacia antitumorale *in vivo*. 20 topi nudi CD-1 sono stati suddivisi in 4 gruppi di 5 animali ciascuno. Al giorno 0 ogni animale sarà stato sottoposto ad inoculazione con la linea HT-29 ($2,5 \times 10^6$ cellule/topo) per via sottocutanea (s.c.). Un gruppo sarà stato trattato col veicolo (PBS), mentre gli altri 3 gruppi saranno trattati con i virus R-805, R-809 ed R-LM611 in sede intra tumorale (i.t.). La misurazione della massa tumorale sarà effettuata mediante calibro millimetrato due volte a settimana. Saranno eseguiti 4 trattamenti, a 5-15-25-35 giorni dopo l'inoculo della linea cellulare.

Dati preliminari, indicano che la media delle masse tumorali degli animali trattati con il virus bispecifico risulta essere sempre inferiore rispetto alla media del volume delle masse dei topi trattati con il veicolo. Questi dati preliminari, da validare, suggeriscono che R-805 risulta essere efficace nel rallentamento della proliferazione cellulare della linea HT-29.

4.3 Reindirizzamento tramite la glicoproteina fusogenica gB

I dati precedentemente pubblicati e presentati in questa tesi dimostrano che gD e gH accettano l'inserzione di un ligando eterologo e diventano uno strumento per reindirizzare HSV-1 verso un recettore eterologo. Prendendo in considerazione queste recenti scoperte abbiamo voluto modificare il tropismo di HSV-1 ingegnerizzando un ligando eterologo (nel nostro caso un scFv-HER2) nella porzione N-terminale di gB per esplorare nuove strategie di reindirizzamento nel disegno di virus herpes simplex oncolitici.

4.3.1 Ingegnerizzazione dei virus ricombinanti R-903 ed R-909

I virus ricombinanti R-903 ed R-909 sono stati ottenuti col metodo di ricombinazione galK. Inizialmente il scFv-HER2 è stato inserito tra l'aa 43 e 44 della glicoproteina gB, generando il BAC 903. Il BAC 903 porta anche l'inserzione della eGFP e delle sequenze BAC nella regione intergenica U_L3-U_L4 (Fig. 4.3.1 A). Il BAC 909 è stato derivato dal 903 per delezione degli aa 6-38 della glicoproteina gD, regione essenziale per l'interazione della glicoproteina D con i recettori naturali di HSV-1, nectina1 e HVEM. Le altre modificazioni genetiche sono identiche a quelle presenti nel virus R-903 (Fig. 4.3.1 A). Per un riepilogo della nomenclatura e delle proprietà dei virus descritti in questa sezione si fa riferimento alla tabella 4.3. I virus ricombinanti R-903 ed R-909 sono stati generati per trasfezione del DNA BAC in cellule SK-OV-3 e successivamente sono stati amplificati e titolati nella medesima linea. La presenza dell'inserto scFv-HER2 è stata verificata tramite sequenziamento dell'intera ORF della glicoproteina B e per mezzo dell'immunorivelazione di lisati proteici di cellule SK-OV-3 infettate con i virus R-909 e il *wt* R-LM5. Per l'immunorivelazione, lisati di cellule SK-OV-3 infette con i virus sopracitati sono stati sottoposti a SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) e le proteine di membrane sono state rivelate con un anticorpo monoclonale diretto contro gB. Come mostrato in Fig. 4.3.1 B, la proteina chimerica gB-scFv (in figura gB_{HER2}) migra ad una velocità elettroforetica minore rispetto a gB *wt* espressa dal virus R-LM5.

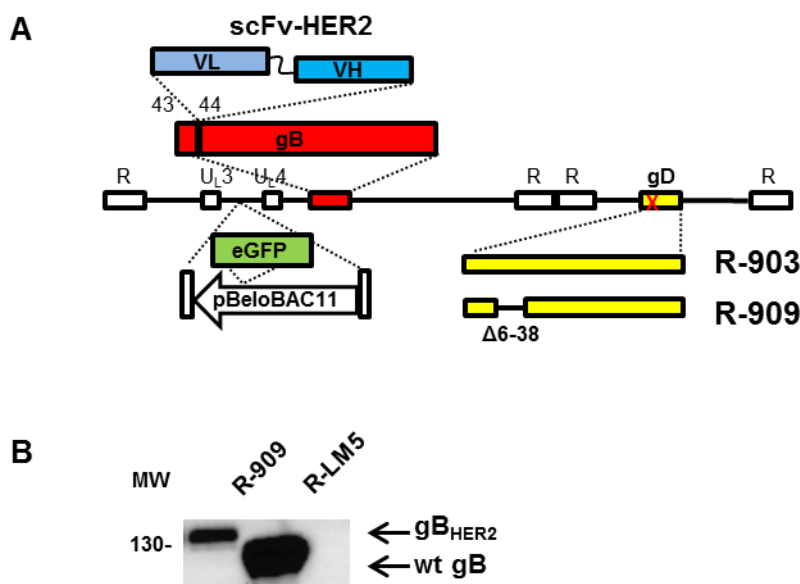


Fig. 4.3.1 – Rappresentazione schematica dei genomi di R-903 ed R-909 ed espressione della chimera gB_{HER2}.

A) Riproduzione schematica dei genomi di R-903 ed R-909. Il scFv-HER2, nel quale si possono distinguere la regione variabile leggera VL e quella pesante VH, è inserito tra gli aa 43 e 44 di gB; le sequenze BAC pBeloBAC11 e la proteina marker fluorescente eGFP tra U_L3 e U_L4. La sequenza di gD è *wt* in R-903 e deleta degli aa 6-38 in R-909. B) Immunorivelazione della proteina chimera gB_{HER2}. Lisati di cellule SK-OV-3 infettate con R-909 e, per confronto, con il *wt* R-LM5 sono stati sottoposti a SDS-PAGE e immunorivelazione. I numeri sulla sinistra indicano il peso molecolare del marker, espresso in kilodalton (kDa).

Tabella 4.3 – Modificazioni genotipiche e tropismo dei virus impiegati in questa sezione.

Virus	gD	gH	gB	Reindirizzamento verso HER2	De-indirizzamento da nectina1/HVEM
R-903	wt	wt	scFv-HER2	+	-
R-909	Δ6-38	wt	scFv-HER2	+	+
R-LM113	scFv-HER2 in Δ6-38	wt	wt	+	+
R-809	Δ6-38	scFv-HER2	wt	+	+
R-LM5	wt	wt	wt	-	-
HSV-1(F)	wt	wt	wt	-	-

4.3.2 R-903 ed R-909 sono reindirizzati a cellule che esprimono HER2

Le modifiche al tropismo sono state valutate in cellule di criceto J che esprimono i transgeni per i recettori HVEM, nectina1 o HER2. Le cellule sono state esposte ai virus R-903, R-909 e, per confronto, al *wt* R-LM5 e al HER2-reindirizzato R-809. L'infezione è stata osservata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione. La Fig. 4.3.2 A mostra che i virus R-903 ed

R-909 sono in grado di infettare le cellule J-HER2, dando prova in questo modo di essere efficacemente reindirizzati al recettore HER2. R-903 infetta anche le cellule J-nectina1 e J-HVEM poiché esprime una gD *wt*. Contrariamente, R-909 non è più in grado di infettare attraverso i recettori naturali di gD, in accordo con la delezione degli aa 6-38 in gD. R-909 mostra un pattern d'infezione analogo a quello del virus R-809, reindirizzato al recettore HER2 tramite inserzione del scFv-HER in gH. Come atteso, il virus *wt* R-LM5 infetta le cellule che esprimono i recettori di HSV-1 (nectina1 e HVEM) e non infetta le J-HER2. Abbiamo quindi voluto ampliare il pannello di cellule HER2 positive e negative su cui saggiare l'infezione del virus ricombinante R-909. In particolare R-909 è stato testato per la sua abilità di infettare cellule cancerose HER2 positive (SK-OV-3, BT-474, MDA-MB-453) e negative (HeLa, MDA-MB-231) e la linea HER2 negativa dei cheratinociti HaCaT. Il virus R-903 che codifica ancora per la gD *wt*, è stato incluso come controllo. I risultati mostrati in Fig. 4.3.2 B dimostrano che R-909 infetta specificatamente le cellule HER2 positive, contrariamente al virus R-903 che infetta indiscriminatamente entrambi i set di cellule. I risultati rafforzano la conclusione che R-909 è reindirizzato verso HER2 *via* gB e non è più in grado di riconoscere i recettori naturali di gD, per via della delezione 6-38 in gD.

Da questa prima serie di esperimenti si possono trarre tre importanti conclusioni. In primo luogo, l'inserzione di un scFv in gB modifica il tropismo cellulare di HSV-1. E' un dato sorprendente, dato che gB è nota per la sua attività fusogenica, ma non come determinante del tropismo di HSV-1. Secondariamente, l'osservazione che R-909 infetti le cellule J-HER2, ma non le J, suggerisce che il scFv inserito in gB ne determini l'attivazione a seguito dell'interazione con HER2. L'attivazione di gB a seguito del legame l'HER2 esclude la possibilità che l'attivazione di gB avvenga indipendentemente dal legame con il recettore HER2. Infine, l'infezione delle cellule J-HER2 si osserva in assenza dei recettori di gD, o con una gD deleta incapace di legare i recettori naturali. Ne segue che l'infezione in questo caso è indipendente dall'attivazione di gD, che parte dal legame ai suoi recettori. Questo implica che nel virus R-909 la cascata di attivazione delle glicoproteine che porta alla attivazione di gB non avvenga in maniera canonica, in altre parole non inizi dal legame di gD ai suoi recettori e alla trasmissione del segnale e attivazione delle glicoproteine a valle gH/gL ed infine di gB.

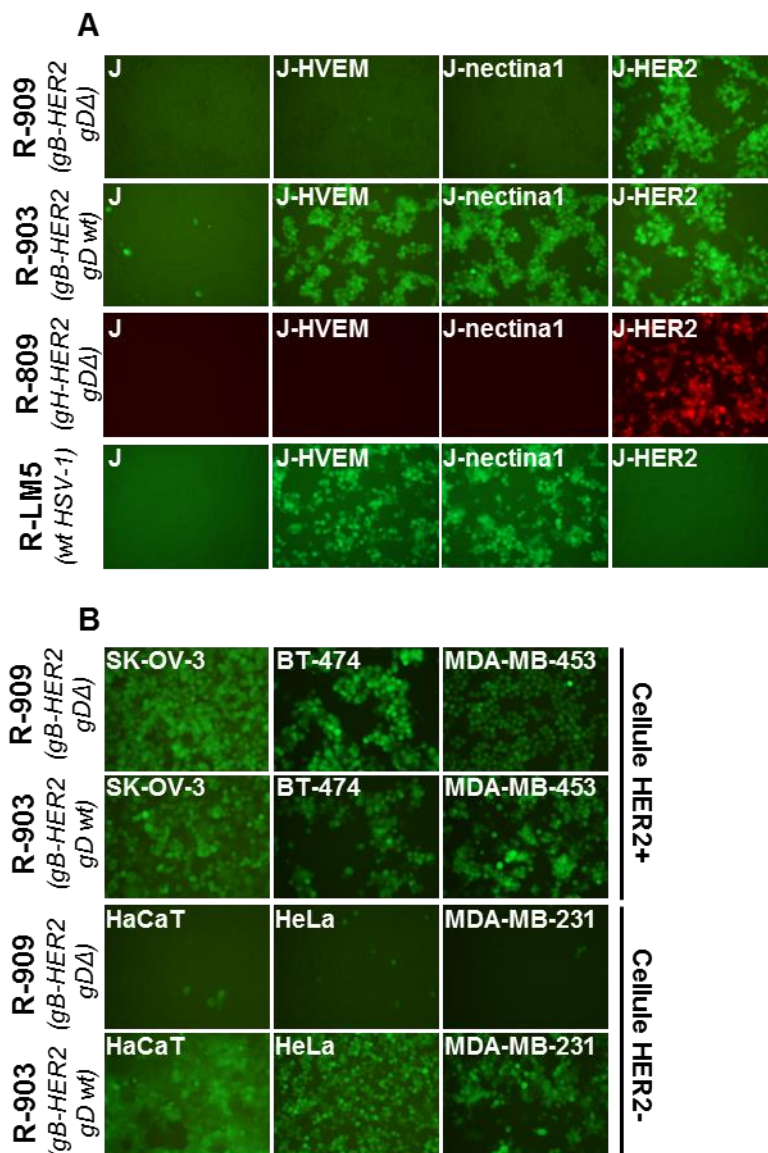


Fig. 4.3.2 - R-909 infetta specificatamente cellule HER2+. A) Pattern d'infezione di R-903 ed R-909 in cellule J. Sia R-909, che il virus R-903 che codifica ancora una gD wt, infettano le J-HER2, cellule che esprimono HER2 come unico recettore. Le cellule J non esprimono i recettori naturali di HSV-1. Le cellule J-HER2, J-nectina1 e J-HVEM esprimono solo i recettori indicati. Il pattern d'infezione di R-909 è analogo a quello di R-809 e differisce da quello del wt R-LM5. B) Pattern d'infezione di R-903 ed R-909 in cellule umane HER2 positive e negative. R-909, ma non R-903 infetta specificatamente cellule HER2+, e non è in grado di infettare cellule HER2-. In tutti i pannelli, le cellule indicate sono state infettate a 3 PFU/cellula e l'infezione è stata monitorata al microscopio a fluorescenza a 24 ore dall'infezione.

4.3.3 Replicazione e citotossicità del virus ricombinante R-909

Dopo aver verificato il tropismo cellulare del virus ricombinante R-909, abbiamo proseguito il nostro studio analizzando la capacità replicativa e la citotossicità del virus in cellule tumorali. Di fatto, l'inserzione di un ligando eterologo, nel nostro caso un scFv-HER2 di 259 aa, nella

proteina di HSV-1 deputata alla fusione, potrebbe avere avuto degli effetti deleteri sull'efficacia di ingresso del virus nella cellula. L'ingresso del virus è un fenomeno estremamente difficile da misurare direttamente. Metodi indiretti che si possono fornire includono la misura della replicazione e dello *spread* laterale, ossia la capacità del virus di passare da una cellula all'altra. Per l'esperimento di crescita dei virus ricombinanti *in vitro*, cellule tumorali HER2 positive SK-OV-3 state seminate in piastre repliche e infettate con i diversi virus ricombinanti. R-909 è stato confrontato con i virus ricombinanti modificati in gH (R-809) e in gD (R-LM113) e con un *wt*, HSV-1(F). Le piastre repliche sono state congelate a 3, 24, or 48 ore dall'infezione e la progenie virale (cellule infette e surnatante) è stata titolata in cellule SK-OV-3. La Fig. 4.3.3 A dimostra che R-909 cresce a titoli molto simili a quelli di R-809 e a circa un logaritmo al di sotto di R-LM113. Tutti i virus reindirizzati replicano con un'efficienza di circa 1-2 logaritmi in meno rispetto al virus parentale HSV-1(F).

Per avere una misura del passaggio cellula-cellula, abbiamo determinato la grandezza delle placche. Diluizioni scalari dei virus R-909, R-809, R-LM113 ed R-LM5 sono state piastrate su monostrati di cellule SK-OV-3. Le cellule infette sono state ricoperte con un mezzo nutriente contenete agar e a 3 giorni dall'infezione sono state scattate le foto al microscopio a fluorescenza.

Foto rappresentative, assemblate nella Fig. 4.3.3 B dimostrano che R-909 è in grado di formare placche più grandi rispetto ai virus R-809 ed R-LM113. Di contro, placche formate dal *wt* R-LM5 sono risultate ancora più estese. I numeri in parentesi, a fianco dei virus, indicano l'area espressa in px^2 (pixel al quadrato). I risultati ottenuti da questi primi esperimenti dimostrano che l'inserzione del scFv-HER in gB non impatta in modo negativo sulla replicazione e *spread* laterale di HSV-1.

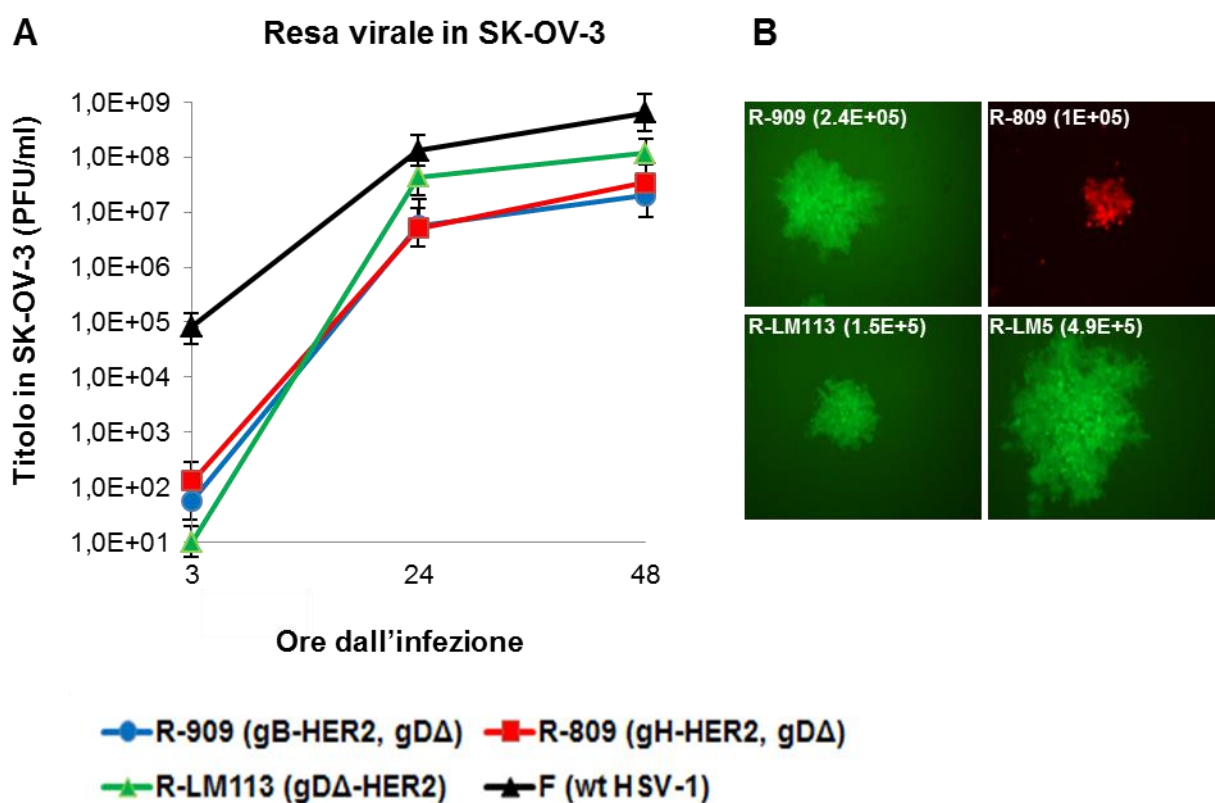


Fig. 4.3.3 – Misura della replicazione e grandezza placche del virus R-909 in SK-OV-3. A) Curve di crescita dei virus indicati in cellule SK-OV-3. Cellule SK-OV-3 sono state infettate con i virus R-909, R-809, R-LM113 e con il wt HSV-1(F) ad una MOI di 0,1 PFU/cellula e raccolte al tempo indicato. La progenie virale è stata titolata in cellule SK-OV-3. B) Grandezza delle placche in SK-OV-3. Per la determinazione della grandezza delle placche, sono state scattate al microscopio a fluorescenza 20 foto per ciascun virus ricombinante, a 72 ore dall'infezione. L'area della placca (in px^2) è stata misurata con il software Nis Elements-Imaging (Nikon).

L'attività oncolitica *in vitro* del ricombinante R-909 per le linee umane tumorali HER2 positive è riportata nella Fig. 4.3.4 A-B. La citotossicità di R-909 è molto simile a quella esibita da R-809 e dal wt HSV-1(F), specialmente a 7 giorni dall'infezione. Al 7° giorno dall'infezione, la citotossicità indotta da R-909 si assesta dal 70 al 90% per le cellule HER2 positive SK-OV-3 ed MDA-MB-453. R-909 ed R-809 non infettano le cellule MDA-MB-231, per cui non hanno alcun effetto sulla vitalità cellulare di questa linea (Fig. 4.3.4 C).

Nel complesso, i risultati indicano che il reindirizzamento ottenuto con l'ingegnerizzazione della glicoproteina B conferisce ad HSV-1 proprietà molto simili al reindirizzamento conseguito tramite gH, in termini di replicazione virale e attività oncolitica *in vitro*.

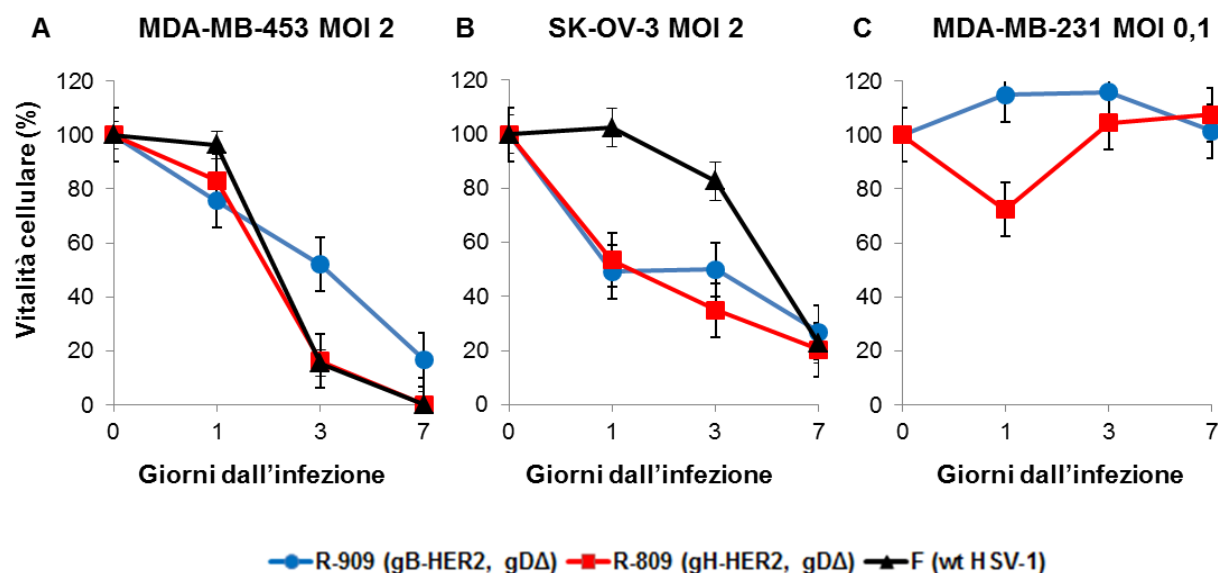


Fig. 4.3.4 – Abilità citotossica di R-909 in linee tumorali HER2 positive ed HER2 negative. Le cellule cancerose HER2 positive, SK-OV-3 (A) ed MDA-MB-453 (B), sono state infettate con i virus ricombinanti R-909, R-809 e con il wt HSV-1(F) ad una MOI di 2 PFU/cellula. La linea cancerosa HER2 negativa MDA-MB-231 è stata infettata ad una MOI putativa di 0.1 PFU/cellula. La vitalità è stata determinata a 1, 3 e 7 giorni dall'infezione con il metodo alamarBlue. Ogni valore rappresenta la media di triplicati \pm S.D.

4.3.4 L'infezione di R-909 è mediata da HER2 e inibita da anticorpi diretti contro gD, gH e gB

Per analizzare il ruolo di HER2 nella penetrazione di R-909, abbiamo fatto uso di cellule J-HER2, che esprimono HER2 come unico recettore, e SK-OV-3 che esprimono sia i recettori naturali di HSV-1 (nectina1 e HVEM) che il recettore tumorale HER2. Come controlli, abbiamo incluso il virus R-LM113 ed il virus wt R-LM5. Cellule J-HER2 e SK-OV-3 sono state infettate con i virus indicati in Fig. 4.3.5, in presenza del MAb trastuzumab (diretto contro l'HER2) o di IgG murine di controllo. L'infezione è stata monitorata a 24 ore al microscopio a fluorescenza e quantificata al citofluorimetro. Come risulta evidente dalla Fig. 4.3.5 A, l'infezione dei virus R-909 ed R-LM113 viene inibita dal trastuzumab sia in cellule J-HER2 sia in SK-OV-3, confermando che entrambi i virus utilizzino HER2 per entrare nelle cellule J-HER2. Come atteso, l'infezione del wt R-LM5 non viene inibita a seguito del trattamento del trastuzumab in nessuna delle due linee testate.

Questo risultato e l'implicazione che R-909 non richiede la canonica cascata di attivazione delle glicoproteine innescata dall'interazione di gD con la nectina1 o l'HVEM, ci ha spinto a caratterizzare ulteriormente il processo d'ingresso del virus R-909. Abbiamo quindi ampliato il pannello di anticorpi utilizzati nel saggio e verificato se l'infezione del virus R-909 fosse inibita

dagli anticorpi neutralizzanti diretti verso gB, gD e gH. I virus R-LM113 ed R-LM5 sono stati inclusi per confronto. I virioni sono stati pre-incubati con i MAb diretti contro gD (HD1), contro gH (52S) o contro gB (H126). Per il MAb HD1 sono state testate due concentrazioni: una concentrazione “bassa”, che blocca l’ingresso di un HSV-1 *wt*, ed una concentrazione “alta” venti volte superiore. Tutti gli anticorpi testati hanno inibito l’infezione con R-909 sia in cellule J-HER2 sia in SK-OV-3 (Fig. 4.3.5 B-C); a basse concentrazioni, il MAb HD1 non è stato in grado di inibire l’ingresso di R-909 ed R-LM113, come precedentemente osservato (vedi Fig. 4.1.5). I risultati indicano che l’infezione di R-909 richiede le glicoproteine essenziali gB, gD e gH.

L’osservazione che il recettore HER2 è in grado di mediare l’ingresso di HSV-1 una volta che il scFv-HER2 è stato inserito in gD, gH o gB, pone la domanda sul meccanismo col quale HER2 medi l’ingresso di questi tre tipi di ricombinanti. Gli esperimenti successivi pertanto sono stati finalizzati a rispondere a questa domanda e sono stati condotti confrontando R-909 con il virus gH-reindirizzato R-809 ed il virus gD-reindirizzato R-LM113.

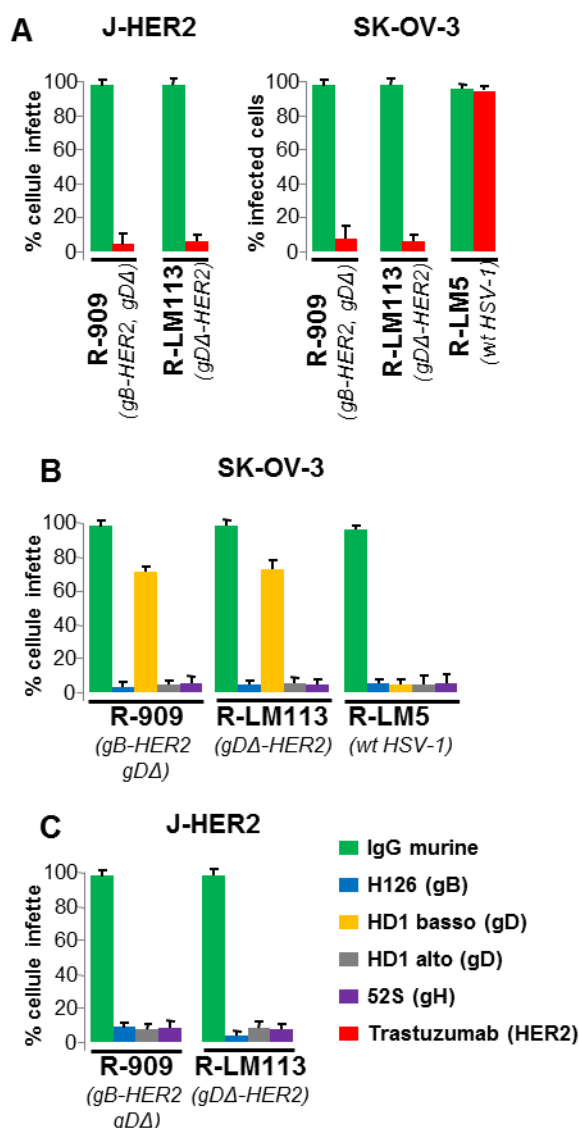


Fig. 4.3.5 – R-909 utilizza HER2 come portale d’ingresso e l’infezione è inibita dagli anticorpi neutralizzanti contro gB, gD, gH. (A) Cellule J-HER2 e SK-OV-3 sono state pre-trattate con il trastuzumab o con le IgG murine di controllo (28 µg/ml) e in seguito infettate con R-909, R-LM113 e con il wt R-LM5. B-C) I virus R-909, R-LM113 e il wt R-LM5 sono stati pre-incubati con gli anticorpi monoclonali diretti contro gD (HD1 “basso”, 1,5 µg/ml; “alto” 30 µg/ml), contro gH (52S, fluido di ascite diluito 1:25), o contro gB (H126, fluido di ascite diluito 1:2000) e utilizzati per infettare cellule SK-OV-3 (B) o J-HER2 (C). L’infezione è stata quantificata 24 ore dopo al citofluorimetro ed espressa in rapporto alle cellule infette non pre-trattate con gli anticorpi. Ogni valore rappresenta la media di tre esperimenti indipendenti ± S.D.

4.3.5 Ruolo di gD nella fusione cellulare mediata dalle glicoproteine chimeriche gB e gH

La necessità della presenza della glicoproteina D durante l'infezione col virus R-909 è in apparente contraddizione con l'infezione, indipendente dall'attivazione mediata dai recettori di gD, osservata in cellule J-HER2 e potrebbe riflettere molteplici funzioni di questa glicoproteina. In particolare, in aggiunta al ruolo di innesco della cascata di attivazione a seguito del legame ai suoi recettori, gD potrebbe svolgere un ruolo "strutturale" (164). In quanto le glicoproteine si assemblano in complessi anche in assenza dei recettori di gD (167), la completa assenza di una delle glicoproteine o il legame degli anticorpi, potrebbe influenzare la struttura/stabilità/stechiometria del complesso.

Le glicoproteine chimeriche gH_{HER2} e gB_{HER2} offrono l'opportunità di separare ed analizzare queste due funzioni di gD. Un saggio funzionale surrogato dell'infezione, e utilizzato per studiare il contributo delle singole glicoproteine durante l'infezione, è il saggio di fusione cellula-cellula. In questo saggio che non utilizza il virus, le cellule dette "effettrici" sono trasfettate con le glicoproteine virali e la polimerasi T7, mentre le cellule dette "bersaglio" sono trasfettate con il recettore d'interesse e un plasmide che codifica per il promotore T7 che guida l'espressione del gene luciferasi. La fusione è quantificata come espressione della luciferasi dopo aver unito le due tipologie di cellule. Le cellule scelte per questo esperimento sono state le CHO-KI (cellule di ovaio di criceto cinese) che non sono esprimono sulla propria superficie recettori canonici di HSV-1.

Abbiamo pertanto allestito un saggio di fusione cellulare, nel quale le cellule effettrici esprimono le glicoproteine e la polimerasi T7, mentre le cellule bersaglio esprimono il recettore (HER2 o nectina1) insieme al promotore T7 che guida l'espressione della luciferasi. gB_{HER2} è stata clonata dal virus R-909, mentre la gH_{HER2} da R-803. Per simulare la situazione dei ricombinanti R-909 ed R-809, abbiamo clonato anche la gD_{Δ6-38}. Queste glicoproteine, o la loro controparte wt, sono state trasfettate nelle combinazioni appropriate. La Fig. 4.3.6 A dimostra che la combinazione delle glicoproteine che include gB_{HER2} o gH_{HER2} promuove la fusione nelle CHO-nectina1, in presenza di una gD wt. Questo risultato implica che gB_{HER2} e gH_{HER2} mantengono la capacità fusogena o pro-fusogena della controparte wt, sebbene in misura minore. In assenza di gD, l'attività di fusione cala drasticamente di 2-3 logaritmi e raggiunge i livelli del background (valore medio di 5×10^3 unità relative di luciferasi, R.L.U.), suggerendo che la gD non possa essere omessa. La Fig. 4.3.6 B dimostra che la combinazione delle glicoproteine che include gB_{HER2} o gH_{HER2} promuove una significativa attività di fusione in cellule CHO-HER2, di nuovo in misura minore della loro controparte wt nelle CHO-nectina1. gB e gH wt non inducono la

fusione, se trasfettate in cellule CHO-HER2. La fusione con le cellule CHO-KI negative per i recettori di HSV-1 si assesta ai livelli di fondo (Fig. 4.3.6 C).

Si può concludere pertanto, che i dati ottenuti mediante il saggio di fusione cellulare sono in linea con il pattern d'infezione dei virus R-909 ed R-809 in cellule HER2-positive. gD *wt* può essere sostituita da gD_{Δ6-38}, in accordo con i dati sulle infezioni. Tuttavia, la fusione cellulare non è rilevabile in totale assenza di gD. Perciò, sebbene gD *wt* o gD_{Δ6-38} non possano essere attivate dal recettore HER2, e perciò non svolgono il ruolo di innesco della fusione, gD non può essere totalmente omessa. In conclusione, i risultati forniscono evidenze sperimentali a favore di un ruolo di gD diverso da quello dell'innesco della fusione, verosimilmente a favore del suo ruolo strutturale.

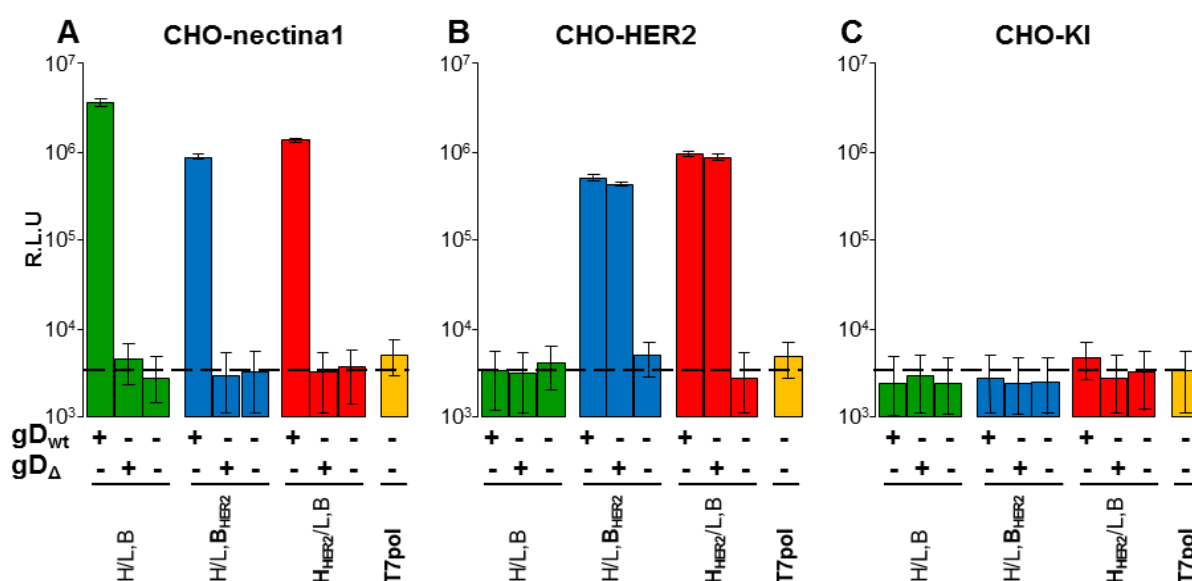


Fig. 4.3.6 – gD è richiesta per promuovere la fusione cellulare mediata dalle glicoproteine gB_{HER2} o gH_{HER2}.

A-C) Cellule effettrici CHO-KI, che non esprimono i recettori per HSV-1, sono state trasfettate con la polimerasi T7 e con diverse combinazioni delle seguenti glicoproteine: gD *wt*, (gD_{wt}), gD_{Δ6-38} (gD_Δ), gH *wt* (H), gH_{HER2} (H_{HER2}), gB *wt* (B), gB_{HER2} (B_{HER2}), gL *wt* (L). Le cellule bersaglio sono state trasfettate con il gene della luciferasi posto sotto il controllo del promotore T7 e con il recettore nectina1 (A), HER2 (B), o non sono state trasfettate con alcun recettore (C). Il livello di fusione è espresso in unità relative di luciferasi (R.L.U.) Ogni colonna rappresenta la media dei triplicati dei campioni \pm S.D.

4.3.6 L'ingresso di R-909 non richiede le integrine $\alpha\beta 6$ o $\alpha\beta 8$ e non risulta nel distacco di gL dall'eterodimero gH/gL

Precedentemente, il nostro laboratorio ha documentato che le integrine $\alpha\beta 6$ o $\alpha\beta 8$ fungono da recettori di HSV-1, legando gH e contribuendo alla sua attivazione (43, 168). Pertanto, le integrine $\alpha\beta 6$ o $\alpha\beta 8$ sono parte di un meccanismo di attivazione delle glicoproteine di HSV-1

che inizia con il legame di gD ai suoi recettori. Il quesito che ci siamo posti è se l'infezione dei virus reindirizzati R-909, R-809 ed R-LM113 richiedesse, come il *wt* R-LM5, le integrine $\alpha\beta6$ o $\alpha\beta8$. Cellule SK-OV-3, che esprimono nectina1, l'HVEM e le integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$, sono state simultaneamente silenziate con i siRNA diretti contro per le subunità $\beta6$ e $\beta8$, o trattate con un siRNA di controllo (Fig. 4.3.7 A), e in seguito infettate con i virus ricombinanti R-909, R-809 ed R-LM113. Abbiamo incluso R-LM5 come controllo di un HSV-1 *wt*. L'infezione è stata quantificata al citofluorimetro. I risultati riportati in Fig. 4.3.7 B dimostrano che l'infezione con il virus R-909 non ha risentito della deplezione delle integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$. In modo analogo, neanche l'infezione con il virus reindirizzato tramite gH, R-809, ha subito un calo dell'infezione a seguito della deplezione delle integrine β . In contrasto, l'infezione con il *wt* R-LM5 è stata praticamente abolita. L'infezione con il virus reindirizzati tramite gD, R-LM113, ha subito una notevole riduzione, ma non è stata completamente abbattuta.

Dunque, i virus ricombinanti reindirizzati tramite gB e gH non richiedono o richiedono in misura minima le integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$ per portare a termine un'infezione efficiente. Contrariamente, l'infezione del virus *wt* e del virus reindirizzato tramite la gD, R-LM113 necessita la presenza delle integrine $\alpha\beta6$ e $\alpha\beta8$. In breve, sembra che ci sia un gradiente in termini della dipendenza dalle integrine che parte dai virus *wt* e gD-reindirizzati e giunge ai virus ricombinanti gH e gB-reindirizzati.

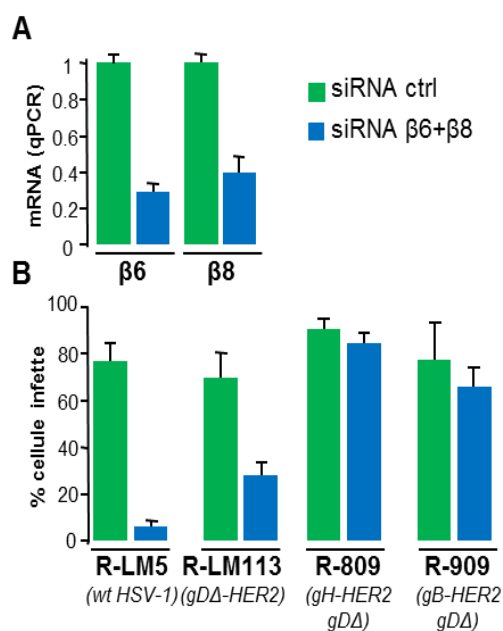


Fig. 4.3.7 – Inibizione dell'infezione in cellule delete delle subunità $\beta6$ e $\beta8$ delle integrine. A) Livello di silenziamento delle integrine. Cellule SK-OV-3 sono state simultaneamente silenziate per le integrine $\beta6$ e $\beta8$ (siRNA $\beta6+\beta8$) o trattate con un siRNA di controllo (siRNA ctrl). Il grado di silenziamento è stato misurato per mezzo della qPCR ed espresso in rapporto alle cellule trattate con il siRNA di controllo. Ogni valore in colonna rappresenta la media di triplicati di tre esperimenti indipendenti \pm S.D. (B) Effetto del silenziamento delle integrine sull'infezione. Cellule SK-OV-3 silenziate con i siRNA $\beta6+\beta8$ o con il siRNA ctrl sono state infettate con il *wt* R-

LM5 o con i ricombinanti R-LM113, R-809 ed R-909 ad una MOI di 5 PFU/cellula. L'infezione è stata quantificata, 24 ore dopo, al citofluorimetro. Il valore di ogni colonna rappresenta la media dei triplicati \pm S.D.

Il ligando delle integrine $\alpha\beta 6$ o $\alpha\beta 8$ è gH/gL. I lavori di Gianni e colleghi hanno dimostrato che le integrine inducono un cambiamento conformazionale in gH/gL, che risulta nel distacco di gL dall'eterodimero gH/gL (44). Il distacco avviene a livello dell'attacco/ingresso, ed è neutralizzato da condizioni che bloccano l'ingresso del virus. Richiede la presenza di tutte le componenti dell'apparato d'ingresso, in particolare richiede gD attivata da recettore, come anche gB. Diverse evidenze sperimentali indicano che il distacco sia verosimilmente parte del processo di attivazione di gH/gL (44). Il distacco di gL può essere rivelato in cellule che sovra-esprimono le integrine $\alpha\beta 6$, confrontando la reattività dei virioni a due distinti MAb diretti contro gH. Il MAb 52S riconosce un epitopo gL-indipendente, e riflette la quantità totale dei virioni adsorbiti alle cellule. Il MAb 53S riconosce un epitopo, che si forma solamente quando gH eterodimerizza con gL (epitopo gL-dipendente) (158). Una volta che i virioni si attaccano alle cellule, il distacco di gL è messo in evidenza come un decremento della reattività del MAb 53S rispetto a quella del 52S. Ci siamo chiesti dunque, se l'ingresso del gB-reindirizzato R-909 comportasse il distacco di gL, e la conseguente attivazione di gH. Cellule J-HER2 o J-HER2 esprimenti le integrine $\alpha\beta 6$ (J-HER2+ $\alpha\beta 6$) sono state esposte al ricombinante R-909, e per confronto, ai virus R.LM5, R-LM113 ed R-809. La Fig. 4.3.8 A dimostra che:

- l'attacco/ingresso di R-909 nelle cellule J-HER2 o J-HER2+ $\alpha\beta 6$ non è risultato in una riduzione della reattività del 53S in confronto al 52S, a prescindere dalla iper-espressione delle integrine $\alpha\beta 6$.

- Al contrario, l'attacco/ingresso del virus R-LM113 nelle cellule J-HER2+ $\alpha\beta 6$, ma non nelle J-HER2, si è tradotto in una netta riduzione della reattività del 53S, come precedentemente osservato per il *wt*, qui esemplificato dal virus R-LM5.

- L'attacco/ingresso del gH-reindirizzato R-809 è risultato in una riduzione della reattività del 53S, indipendente dalla presenza delle integrine $\alpha\beta 6$. Per cui, il decremento è stato indotto dal recettore HER2 e non dalle integrine.

Nei campioni in cui si è avuta la riduzione della reattività del MAB 53S, si è osservato un concomitante rilascio di gL nel mezzo (Fig. 4.3.8 B). Le conclusioni che si possono trarre sono le seguenti:

- Il distacco di gL mediato dalle integrine $\alpha\beta 6$ ha luogo nel *wt* R-LM5 e nel virus gD-reindirizzato R-LM113. Nel virus R-LM113, al contrario del *wt*, l'attivazione della gD è mediata dal recettore HER2 e non dalla nectina1.

- Il distacco di gL si osserva anche nel gH-reindirizzato R-809; in questo caso è indipendente

dalle integrine $\alpha\beta 6$ ed è mediato dall'HER2 che attiva direttamente gH.

- Il distacco di gL non ha luogo nel gB-reindirizzato R-909, e non è influenzato dalla presenza delle integrine $\alpha\beta 6$.

Nell'insieme, i dati suggeriscono che l'ingresso di R-909 è indipendente dalla integrine β , non porta al distacco di gL e, di conseguenza, l'attivazione di gH mediata dalle integrine non sembra essere un passaggio critico.

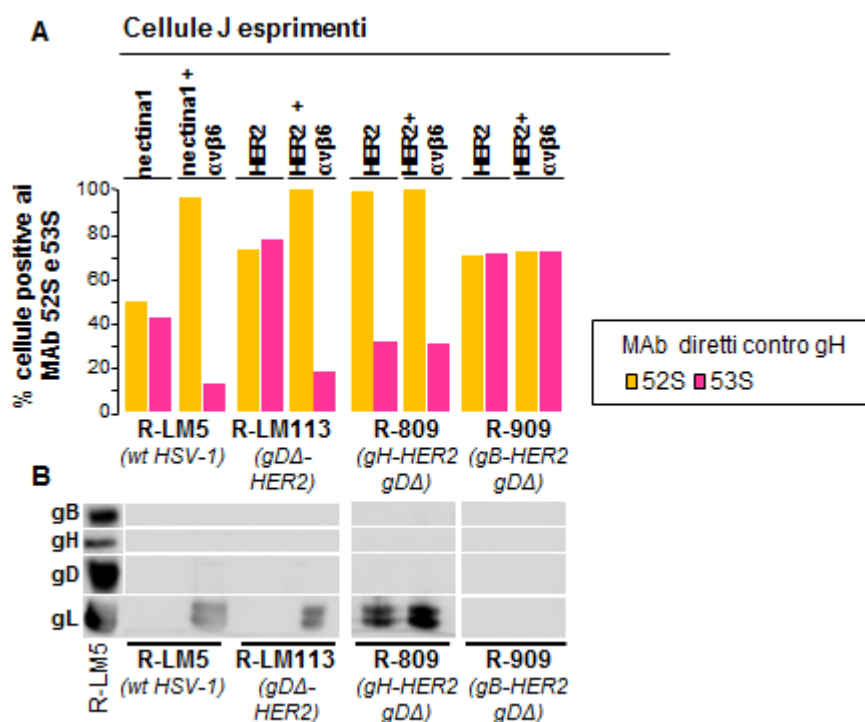


Fig. 4.3.8 – Immunoreattività dei virioni adsorbiti alle cellule ai MAb 52S e 53S e rilascio di gL nel mezzo. A) Immunoreattività dei virioni ai MAb diretti contro gH 52S e 53S. Virioni purificati del virus R-LM5, R-LM113, R-809 ed R-909 sono stati fatti adsorbire per 30 minuti a 37° C a cellule J esprimenti nectina1, nectina1 + integrine $\alpha\beta 6$, HER2 oppure HER2+ integrine $\alpha\beta 6$. Le cellule con i virioni adsorbiti alla superficie, sono state fatte reagire con i MAb 52S (in giallo) e 53S (in rosa) e analizzate al citofluorimetro. I valori in colonna rappresentano i valori delle cellule positive a ciascun MAb. B) Rilascio di gL nel surnatante. Per il rilascio di gL nel mezzo, il surnatante raccolto a seguito dell'assorbimento dei virioni alle cellule (stessi campioni di A), è stato sottoposto ad SDS-PAGE ed immunorivelazione con il PAb diretto contro gH/gL e con i MAb diretti contro gB o gD. La colonna a sinistra "R-LM5" mostra la mobilità elettroforetica delle glicoproteine analizzate.

4.4 Coltivazione di un HSV-1 oncolitico in una linea non tumorale

I virus reindirizzati al recettore HER-2, R-LM113 ed R-LM249, infettano e si replicano solo in cellule esprimenti HER-2. Sono stati saggiati per l'attività oncolitica *in vivo* in modelli di tumore HER-2 positivo sottocutaneo, intraperitoneale e intracranico dimostrando la loro attività oncolitica (51, 169). I risultati promettenti ottenuti in questi studi hanno aperto la strada all'applicazione di HSV-1 reindirizzati al recettore HER-2 per la terapia di tumori metastatici al peritoneo e alla mammella. Le preparazioni virali, utilizzate negli studi preclinici, sono costituite da virus coltivati nella linea umana SK-OV-3, isolata dal carcinoma ovarico HER2-positivo. La produzione di un HSV-1 oncolitico in una linea tumorale non è compatibile con la sperimentazione clinica in quanto non otterrebbe l'autorizzazione dalle agenzie regolatorie. I virus re-indirizzati verso HER2 richiedono l'oncogene HER2 per infettare le cellule, per cui anche una linea che esprimesse il transgene HER2 potrebbe essere considerata non idonea. In quest'ultima sezione, pertanto, sarà descritta una strategia grazie alla quale coltivare un HSV-1 oncolitico, in una linea cellulare non tumorale. La strategia pone le sue basi dalla scoperta di poter ingegnerizzare due ligandi eterologhi in diverse posizioni di HSV-1 (gD, gH e gB) che riescono a reindirizzare simultaneamente il virus verso i corrispettivi recettori. Nel modello da noi formulato, un reindirizzamento sarà ottenuto tramite un ligando ingegnerizzato in gD e diretto verso un recettore tumorale, mentre il secondo reindirizzamento sarà conseguito inserendo in gB un ligando diretto verso un recettore artificiale. Il virus bispecifico dovrebbe essere in grado di utilizzare alternativamente i due recettori per infettare le cellule tumorali o le cellule produttrici non tumorali. Una linea universale non-tumorale per la coltivazione di HSV reindirizzati adatti all'uso in clinica, è un passo in avanti verso la fase traslazionale.

4.4.1 Ingegnerizzazione del peptide GCN4 nella glicoproteina gB del virus R-LM113

Abbiamo ingegnerizzato il peptide GCN4, tra gli aa 43 e 44 della gB del ricombinante R-LM113, col metodo di ricombinazione galK. R-LM113 è un virus HER2-reindirizzato in quanto porta l'inserzione del scFv diretto contro l'HER2 nella gD deleta degli aa 6-38, ai fini dell'eliminazione del tropismo naturale. Il peptide GCN4 (numero di accesso a GeneBank NC_001137.3) di venti aa è parte del fattore di trascrizione GCN4 del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, una proteina di 282 aa coinvolta nella biosintesi degli aminoacidi. La rappresentazione schematica del BAC risultante 313 è riportata in Fig. 4.4.1. Per un riepilogo della nomenclatura e delle proprietà dei virus descritti in questa sezione, si fa riferimento alla tabella 4.4. Il virus ricombinante R-313 è stato generato per trasfezione del DNA BAC in cellule

SK-OV-3 e Vero-GCN4R (la cui costruzione è descritta nel paragrafo successivo) e successivamente è stato amplificato in Vero-GCN4R e titolato in entrambe le linee. La presenza degli inserti GCN4 e scFv-HER2 è stata verificata tramite sequenziamento dell'intera ORF della glicoproteina B e D.

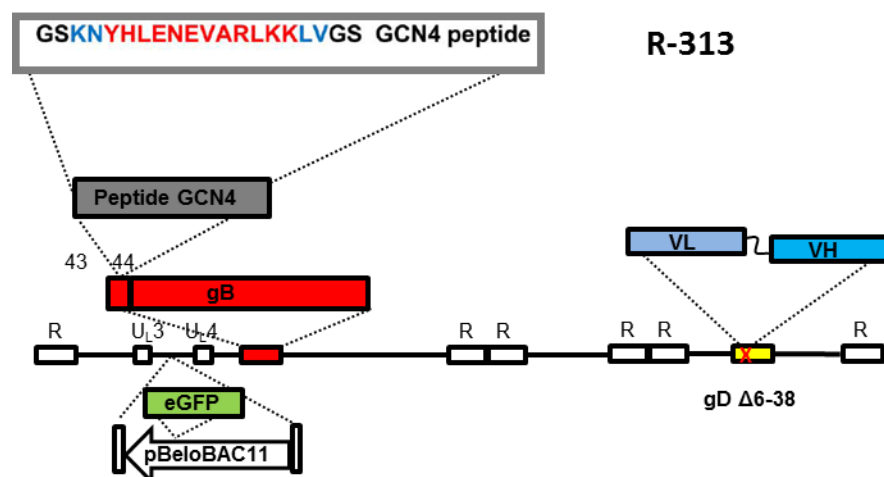


Fig. 4.4.1 - Rappresentazione schematica del genoma del virus ricombinante R-313. Il peptide GCN4 è inserito tra gli aa 43 e 44 di gB. E' riportata la sequenza amminoacidica del peptide GCN4. In rosso sono indicati i residui che formano l'epitopo, in blu residui fiancheggianti l'epitopo e presenti nel fattore di trascrizione GCN4 *wt*; i residui in nero (GS) costituiscono un linker Gly-Ser non presente nella sequenza *wt* del GCN4. La gD, la stessa presente nel virus R-LM113, è deleta della porzione N-terminale che comprende gli aa 6-38, nella quale è inserito il scFv diretto contro l'HER2. Il genoma porta l'inserzione del reporter *Enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) e delle sequenze BAC (pBeloBAC11) nella regione intergenica U_L3-U_L4.

Tabella 4.4 – Modificazioni genotipiche e tropismo dei virus impiegati in questa sezione.

Virus	gD	gH	gB	Reindirizzamento verso HER2	Reindirizzamento verso GCN4R	De-indirizzamento da nectina1/HVEM
R-313	scFv-HER2 in Δ6-38	wt	Peptide GCN4	+	+	+
R-LM113	scFv-HER2 in Δ6-38	wt	wt	+	-	+
R-LM5	wt	wt	wt	-	-	-

4.4.2 Costruzione della linea Vero-GCN4R

Per generare la linea Vero-GCN4R, il scFv derivato da un anticorpo monoclonale ad alta affinità per il peptide GCN4 (20 pM) (154) è stato ingegnerizzato all'N-terminale di un recettore artificiale, qui chiamato GCN4R (Fig. 4.4.2 A). A monte del scFv abbiamo incluso una sequenza leader della catena κ delle Ig murine che indirizza la proteina al *pathway* secretorio, e un *tag* HA

(emoagglutina). A valle del scFv, il recettore chimerico è formato dai domini II e III, dal dominio transmembrana, dalla coda citoplasmatica della nectina1 (rappresentazione schematica in Fig. 4.4.2). Il recettore così composto è stato clonato in un vettore plasmidico pcDNATM3.1/Hygro (+), sotto un promotore CMV, generando il plasmide scFv-GCN4-nectina. Cellule Vero *wt* sono state trasfettate con il plasmide scFv-GCN4-nectina, selezionate per la resistenza all'antibiotico igromicina e clonate per diluizione limite. La linea Vero, isolata da rene di cercopiteco verde, è stata scelta poiché si tratta di una linea cellulare permissiva alle infezioni virali, probabilmente a causa dei difetti nella produzione di IFN I (170). Inoltre il virus oncolitico T-Vec approvato nel 2015 negli USA e nel 2016 in Europa per il trattamento del melanoma in stadio avanzato, è prodotto proprio nella linea Vero. Per valutare la stabilità della linea Vero-GCN4R, l'espressione del recettore chimerico GCN4R è stata analizzata in citofluorimetria per mezzo del MAb diretto contro il tag HA. La Fig. 4.4.2 B dimostra che al 40° passaggio in coltura, la percentuale di cellule positive all'anticorpo HA è di 98,2 %. Questo dato indica che la linea Vero-GCN4R è altamente stabile, rispetto all'espressione del recettore chimerico GCN4R.

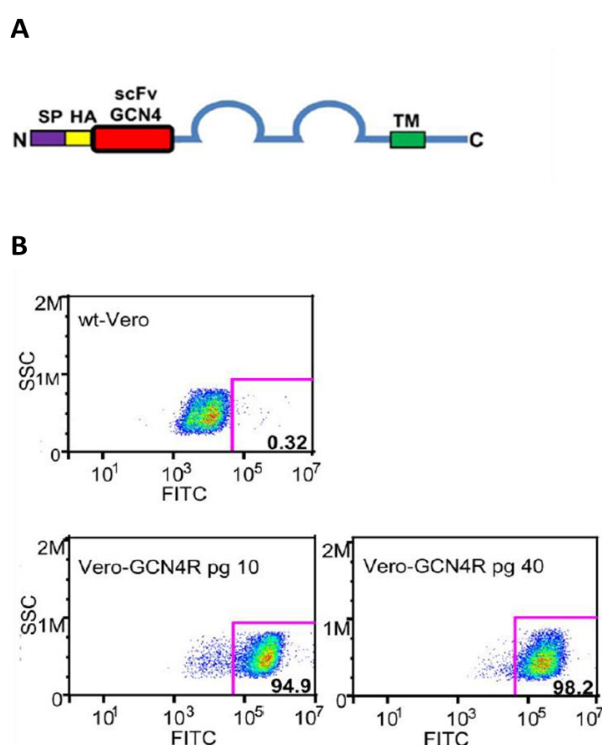
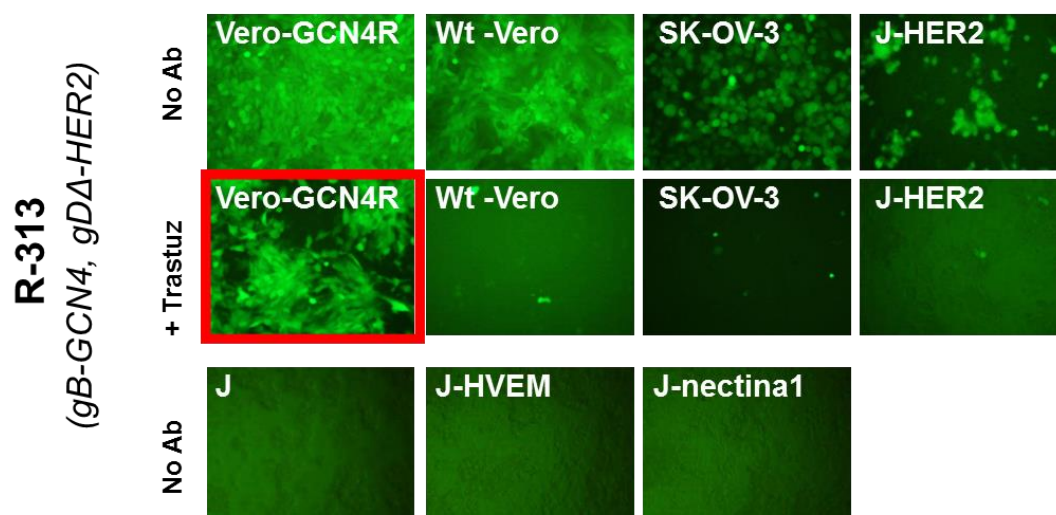


Fig. 4.4.2 - Caratteristiche del recettore chimerico GCN4R e sua espressione nella linea Vero-GCN4R. A) Rappresentazione schematica del recettore GCN4R. Il recettore è formato da un peptide segnale all'N-terminale (in viola), una sequenza tag di HA di (in giallo), il scFv diretto contro il peptide GCN4, fiancheggiato da due corti linker (GA e GSGA), i residui che vanno dalla Met143 alla Val517, della nectina1 umana, che includono i domini extracellulari II e III, il segmento transmembrana TM e la coda citoplasmatica. B) Stabilità della linea Vero-GCN4R. L'espressione del recettore chimerico GCN4R è stata analizzata in citofluorimetria per mezzo del MAb diretto contro il tag HA. Il grafico *dot-plot* mostra la percentuale di cellule Vero *wt* e Vero-GCN4R in coltura positive all'anticorpo anti-HA al 10° e 40° passaggio (pg).

4.2.3 Il duplice tropismo del virus R-313 verso i recettori GCN4R ed HER2

Per verificare il duplice tropismo per il GCN4R e per l'HER2, abbiamo testato R-313 per l'abilità di infettare le Vero-GCN4R, la controparte wt Vero, le HER2-positive SK-OV-3 e le J-HER2. Le cellule J non esprimono i recettori per HSV-1 e non sono infettate da un virus wt. Le J-nectina1, le J-HVEM e le J-HER2 esprimono i recettori indicati e sono state incluse come controlli. R-313 è stato confrontato con il virus parentale R-LM113. I risultati presentati in Fig. 4.4.3 indicano che R-313 è in grado di infettare le Vero-GCN4R, le SK-OV-3 e le J-HER2. R-313 infetta anche le wt Vero, poiché questa linea esprime l'ortologo di scimmia (si veda anche l'infezione con L'R-LM113). L'infezione di R-313 in cellule Vero, SK-OV-3 e J-HER2 è inibita dal pre-trattamento delle cellule con il MAb trastuzumab diretto contro l'HER2, indicando che in queste cellule l'infezione è mediata dal recettore HER2. L'infezione delle Vero-GCN4R risulta solo parzialmente inibita dal trastuzumab, suggerendo che l'infezione avviene tramite il recettore GCN4R. Come atteso, R-313 non è in grado di infettare le cellule J, le J-nectina1 e le J-HVEM, indicando che il virus mantiene il profilo di de-reindirizzamento dai recettori naturali esibito da R-LM113. Il profilo d'infezione dell'R-LM113 è molto simile all'R-313, ad eccezione dell'infezione nelle Vero-GCN4R che è inibita dal trastuzumab. I risultati indicano che è possibile re-indirizzare HSV-1 a due diversi recettori, i quali possono essere utilizzati indipendentemente l'uno dall'altro. Il duplice tropismo è stato già descritto per il virus R-805, ma ciò che risulta ancora più sorprendente nel ricombinante R-313 è la dimensione del nuovo ligando eterologo: soli 20 aminoacidi, rispetto ai 247 del scFv-HER2.

A



B

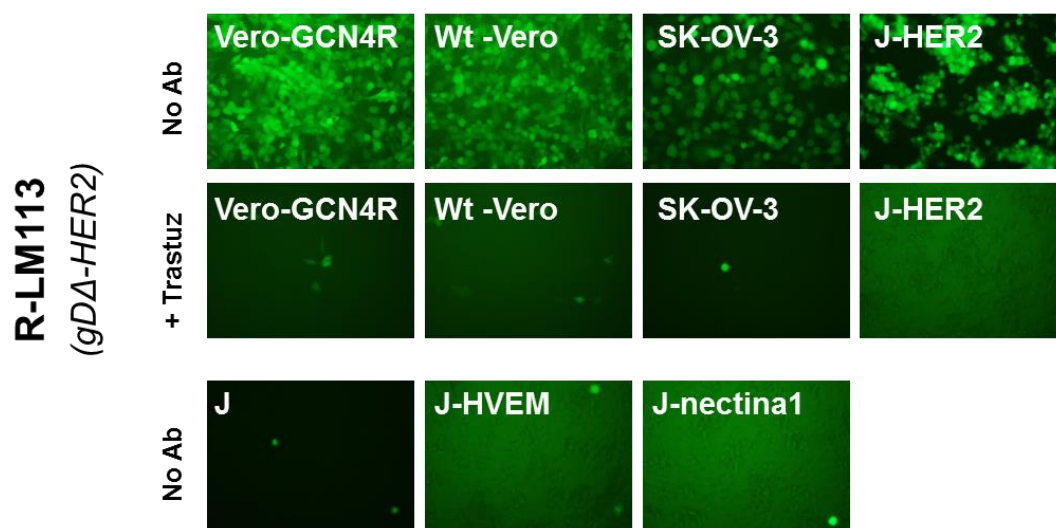


Fig. 4.4.3 – Pattern d’infezione del ricombinanti R-313. Cellule wt-Vero, Vero-GCN4R, SK-OV-3, J parentali e J esprimenti i recettori HER2, HVEM e nectina1 sono state infettate ad una MOI di 3 PFU/cellula con il virus R-313 (A) e per confronto con l’R-LM113 (B). L’infezione è stata monitorata 24 ore dopo al microscopio a fluorescenza. R-313 infetta cellule che esprimono come recettore HER2 (sia umano che di scimmia) o GCN4R e non infetta mediante HVEM e nectina1, in vista della delezione 6-38 nella gD. L’inibizione dell’infezione delle linee HER2-positive con il trastuzumab conferma che R-313 utilizza HER2 come portale d’ingresso in queste cellule.

4.2.4 Replicazione e *spread* del ricombinante R-313 in Vero-GCN4R e SK-OV-3

Abbiamo confrontato la capacità replicativa del virus R-313 a quella del HER2-reindirizzato R-LM113 e al *wt* R-LM5 in cellule Vero-GCN4R e SK-OV-3 (Fig. 4.4.4).

Come risulta dalle curve di crescita riportate in Fig. 4.4.4 A R-313 raggiunge titoli simili ai virus R-LM5 e R-LM113 nelle cellule SK-OV-3. I risultati in Fig. 4.4 B mostrano che nella linea Vero-GCN4R, R-313 replica in maniera simile al *wt* R-LM5 e il titolo è di circa un logaritmo più alto del R-LM113. Si può concludere che la linea Vero-GCN4R permette una buona replicazione del virus R-313 e il peptide GCN4 ingegnerizzato nella gB conferisce a questo virus un vantaggio nella replicazione nella linea Vero-GCN4R rispetto al parentale R-LM113.

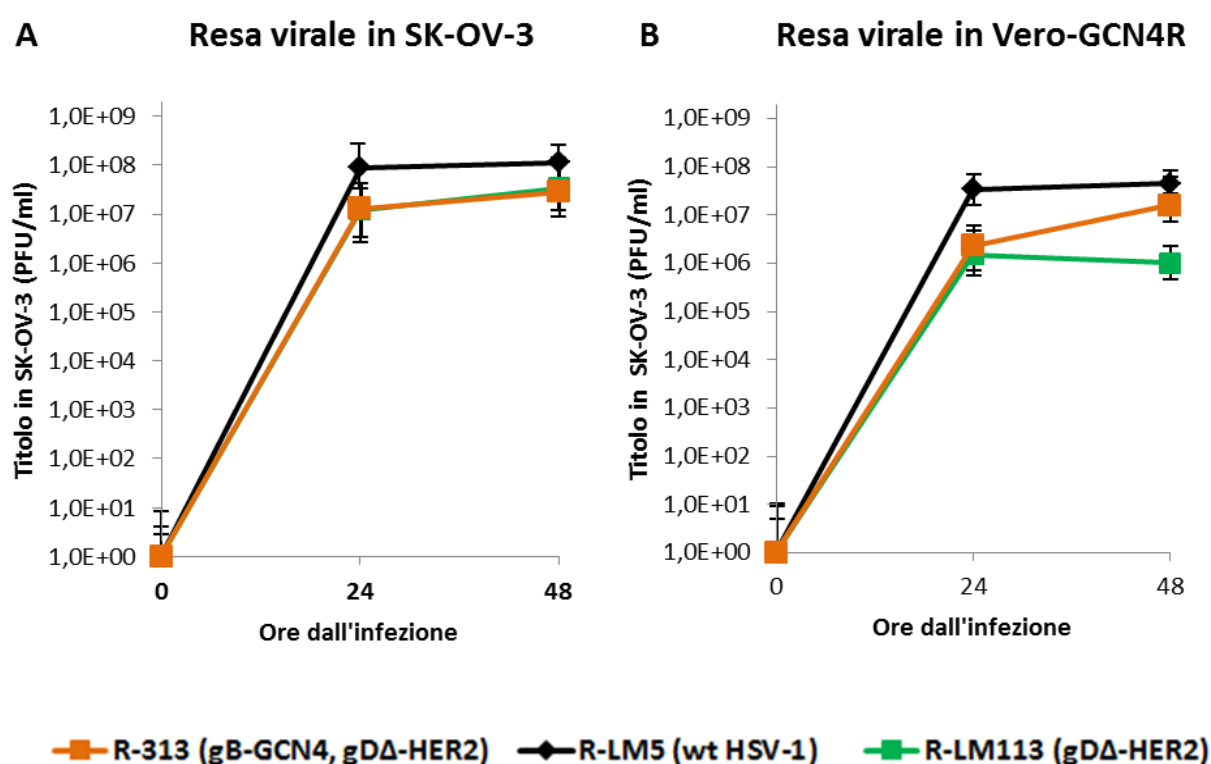


Fig. 4.4.4 – Capacità replicativa del ricombinante R-313 in cellule SK-OV-3 e Vero-GCN4R. Cellule SK-OV-3 (A) e Vero-GCN4R (B) sono state infettate con i virus R-313 e per confronto con l'HER2 reindirizzato R-LM113 e con il *wt* R-LM5 a una MOI di 0,1 e raccolte al tempo indicato. La progenie virale è stata titolata in cellule SK-OV-3. I risultati sono frutto di due esperimenti indipendenti \pm S.D.

Per avere una misura del passaggio cellula-cellula, abbiamo determinato la grandezza delle placche formate dal R-313 in confronto ai virus R-LM5 e R-LM113 in cellule Vero-GCN4R, *wt* Vero e SK-OV-3. Foto rappresentative, assemblate nella Fig. 4.4.5 A dimostrano che R-313 è in grado di formare placche più grandi rispetto al virus parentale R-LM113. Di contro, le placche formate dal *wt* R-LM5 sono risultate ancora più estese. In Fig. 4.4.5 B è riportata la quantificazione delle placche in px^2 (pixel al quadrato). I risultati ottenuti da questi primi

esperimenti dimostrano che l'inserzione del peptide GCN4 si traduce in un aumento della replicazione e *spread* laterale di R-313 rispetto al parentale R-LM113 nella linea Vero-GCN4R.

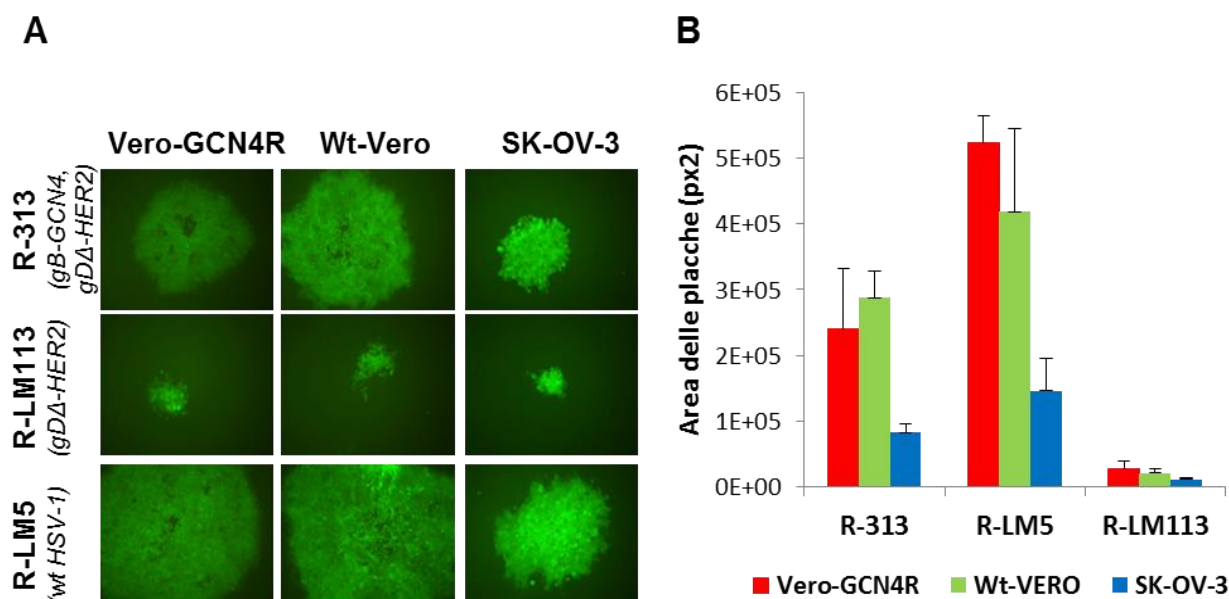


Fig. 4.4.5 – Grandezza delle placche formate da R-313 in cellule Vero-GCN4R, wt-Vero e SK-OV-3. A) Grandezza delle placche. Diluizioni scalari dei virus R-313, R-LM113 e R-LM5 sono state piastrate su monostrati di cellule Vero-GCN4R, wt Vero e SK-OV-3. Le cellule infette sono state ricoperte con un mezzo nutriente contenente agar e a 3 giorni dall'infezione sono state scattate le foto al microscopio a fluorescenza. Foto rappresentative sono riportate nel pannello A. B) Quantificazione della grandezza placche. Per la determinazione della grandezza delle placche, sono state scattate al microscopio a fluorescenza 20 foto per ciascun virus ricombinante, a 72 ore dall'infezione. L'area della placca (in px²) è stata misurata con il software Nis Elements-Imaging (Nikon).

5. Discussione

Il cancro è ancora oggi la seconda causa di morte nel mondo, dopo le malattie cardiovascolari. Nonostante gli sviluppi delle terapie oncologiche, come l'introduzione di farmaci a bersaglio molecolare, alcune tipologie di cancro sono tuttora difficili da trattare. Inoltre le terapie tradizionali, come la chemioterapia e la radioterapia, mostrano a volte una scarsa efficacia e notevoli effetti collaterali che peggiorano ulteriormente la qualità della vita dei pazienti.

La viroterapia oncolitica è un approccio terapeutico alternativo e promettente e fa' uso di virus che si replicano selettivamente nelle cellule tumorali e ne causano la lisi (75, 76). L'HSV-1 è un buon vettore per la terapia oncolitica rispetto ad altri vettori virali (108): i) è un virus citolitico per natura, ii) il genoma comprende numerosi geni non essenziali che possono essere sostituiti con uno o più transgeni terapeutici, iii) sono disponibili in commercio diversi farmaci antierpetici per contrastare una eventuale replicazione indesiderata del virus, iv) il genoma del virus non si integra nella cellula infetta, ma rimane in forma episomiale, anche durante la latenza, precludendo in questo modo la possibilità di mutagenesi inserzionali. Di fatto, un HSV-1, denominato T-Vec (talimogene laherparepvec, IMLYGIC, già OncoVEX GM-CSF), è l'unico virus oncolitico approvato nel 2015 negli USA dall'FDA e nel 2016 in Europa dall'EMA per il trattamento del melanoma metastatico in stadio avanzato (4). Si tratta di un virus attenuato, caratterizzato da delezioni di proteine che contrastano la risposta cellulare antivirale, e la cui replicazione dipende strettamente dalla proliferazione cellulare tumorale. Tuttavia, è emerso chiaramente che, abolendo completamente l'espressione di alcune proteine virali, si attenua la replicazione virale anche in cellule tumorali, poiché queste proteine virali spesso svolgono funzioni multiple (76). In poche parole, la sicurezza è stata ottenuta a spese della virulenza tramite singole o multiple mutazioni/delezioni (123). Un altro limite di questa strategia è che la replicazione virale è strettamente dipendente dai difetti intrinseci nel tumore e non prende in considerazione l'elevata eterogeneità tra le cellule tumorali. Per superare quindi i limiti imposti dall'attenuazione, una strategia alternativa è quella del reindirizzamento recettoriale, che si propone di alterare lo spettro d'ospite del virus. Virus ingegnerizzati in questo modo mantengono la completa capacità litica del ceppo parentale. In teoria, questa strategia offre il vantaggio di poter usare virus molto virulenti e/o in quantità più alte, poiché infetta solo cellule tumorali e diminuisce quindi la tossicità della viroterapia.

Nel laboratorio della Prof.ssa Campadelli sono già stati ingegnerizzati virus ad attività oncolitica (R-LM249 e R-LM113) reindirizzati a un recettore tumorale tramite ingegnerizzazione della glicoproteina di membrana D, fattore chiave per la penetrazione di HSV-1 nelle cellule.

Il progetto di ricerca ERC-2013-AdG 340060 - ONCOLYTIC-HERPES finanziato da ERC

(“European Research Council”) nel quale si inserisce il lavoro di questa tesi prevede lo sviluppo virus herpes simplex 1 (HSV-1) oncolitici, reindirizzati a recettori tumore-specifici, per portarli alla fase traslazionale. Il tropismo di HSV-1 è stato modificato ingegnerizzando un ligando eterologo diretto verso un recettore tumorale nella glicoproteina H o B per esplorare nuove strategie di reindirizzamento nel disegno di virus herpes simplex oncolitici.

Le modifiche in gB o gH sono state combinate con quelle in gD, ottenendo virus reindirizzati contemporaneamente verso due recettori distinti. I punti che riguardano il reindirizzamento tramite gH, il duplice reindirizzamento attraverso gH e gD, il reindirizzamento mediante gB e il reindirizzamento simultaneo *via* gB e gD saranno discussi separatamente nei paragrafi 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, rispettivamente.

5.1 Reindirizzamento di HSV-1 tramite la glicoproteina gH

L'eterodimero gH/gL è altamente conservato all'interno della famiglia *Herpesviridae* ed è essenziale per un efficiente ingresso e fusione cellulare del virus, in quanto agisce da regolatore positivo nel passaggio di gB alla sua forma attiva per la fusione. Abbiamo modificato il tropismo di HSV-1 ingegnerizzando un scFv diretto contro il recettore HER2 per esplorare nuove strategie di reindirizzamento nel disegno di virus herpes simplex oncolitici. HER2 è un recettore orfano, sovra-espresso nel 25% dei tumori della mammella e dell'ovaio, nel 30% dei tumori gastrici e nel 20% dei tumori al polmone e in vari altri tumori (127). L'ingegnerizzazione di un scFv-HER2 in gH conferisce ad HSV-1 un tropismo per cellule che esprimono HER2 come unico recettore. Questo risultato, pubblicato su PLOS Pathogens (164), ha implicazioni importanti sia sulla conoscenza attuale dei meccanismi coinvolti nell'ingresso di HSV-1, che nel campo dei virus oncolitici. Durante la penetrazione di HSV-1 nella cellula, gD assolve a due funzioni principali. E' il maggior determinante del tropismo virale, in quanto la presenza dei suoi recettori determina lo spettro d'ospite. In secondo luogo, gD svolge il ruolo di innesco della fusione, in quanto il suo legame ad uno dei suoi recettori alternativi (HVEM e nectina1), attiva le glicoproteine a valle gH/gL e gB, che eseguono la fusione con la membrana cellulare (11). Rispetto a quanto accade nel virus *wt*, quando il virus reindirizzato in gH infetta cellule J-HER2 (che non esprimono i recettori naturali per HSV-1), l'attivazione della glicoproteina chimerica gH_{HER2} non richiede l'attivazione di gD da parte dei recettori naturali di questa glicoproteina, e non richiede la regione che lega i recettori di gD. In queste condizioni, gD è fisicamente presente, ma poiché è deleta nei residui coinvolti col legame al recettore, non può più legare i recettori (HVEM e nectina1) e di conseguenza non trasmette il segnale di attivazione alle glicoproteine a valle gH/gL e gB. Ne segue che gD non è più indispensabile per l'innesco della

fusione. La sua funzione è stata sostituita dal scFv in gH. In un virus *wt*, l'attivazione trasmessa a gH/gL da parte di gD attivata a sua volta dal legame dai recettori, avviene necessariamente attraverso un *signaling* intermolecolare. Questa tipologia di segnalazione, definita come *trans-signaling* è opposta a quella che ha luogo intramolecolarmente, definita come *cis-signaling*. Un aspetto del tutto nuovo dei nostri risultati è che l'attivazione di gH può avvenire in *cis*, ossia il scFv-HER2, una volta legato al recettore, può attivare direttamente gH. Per quanto riguarda le implicazioni dirette risultati di questa tesi sul campo degli HSV-1 oncolitici, i dati qui pubblicati mostrano che gH accetta l'inserzione di un ligando eterologo e diventa uno strumento per reindirizzare il tropismo di HSV-1 verso il recettore di interesse. Le dimensioni del ligando possono raggiungere i 270 aa, che costituiscono circa un terzo dell'ectodominio di gH. Il reindirizzamento è stato accoppiato con la delezione in gD degli aminoacidi critici per il legame ai recettori. Perseguendo questa strategia, abbiamo generato il virus R-809, la cui capacità replicativa e citotossica non differisce sostanzialmente da quella del virus reindirizzato *via* gD, R-LM113. I virus reindirizzati in gD e gH crescono quanto il virus *wt* e rappresentano un miglioramento della prima generazione di HSV-1 reindirizzati, caratterizzati da una relativamente bassa capacità replicativa (126, 171). E' importante sottolineare che finora l'ingegneria genetica su gD è stato l'unico approccio che ha permesso di reindirizzare con successo il tropismo di HSV-1 (51, 94) mentre tentativi di utilizzare altre glicoproteine, quale gC, non hanno portato a risultati attesi (125).

Questi risultati ampliano le possibili strategie da adottare nel disegno di HSV-1 oncolitici reindirizzati e aprono la strada al trattamento di tumori resistenti al trattamento con farmaci anti-HER2. Per il trattamento dei tumori positivi per HER2, in clinica sono disponibili piccole molecole inibitorie del dominio tirosin chinasi e diversi anticorpi monoclonali che legano l'ectodominio del recettore, quale il trastuzumab. Questi farmaci presentano delle limitazioni. Il trastuzumab non è efficace contro tumori che esprimono bassi livelli di HER2, e solo 1/3 dei pazienti affetti da tumore metastatico della mammella HER2 positivo risponde al trattamento (150, 151). Inoltre, circa il 70% dei pazienti che inizialmente rispondevano al trattamento, nell'arco di un anno sviluppano una recidiva della progressione della malattia metastatica (128). Nelle cellule tumorali resistenti, l'ectodominio di HER2 è preservato e le mutazioni coinvolte nella resistenza mappano nella porzione intracellulare del recettore deputata al *signaling*. Questo tipo di resistenza è ritrovato nelle cellule SK-OV-3, che sono HER2 positive e resistenti al trattamento col trastuzumab. L'osservazione che R-809, come anche R-LM113 (51, 164) è in grado di crescere ed esercitare un'attività oncolitica *in vitro* sulle cellule SK-OV-3, fa presupporre ragionevolmente che pazienti che abbiano sviluppato una resistenza alle terapie anti-HER2 potrebbero beneficiare del trattamento coi virus reindirizzati verso l'HER2.

5.2 Reindirizzamento simultaneo di HSV-1 verso due distinti recettori

L'eterogeneità intrinseca dei tumori rappresenta spesso un limite ai numerosi approcci terapeutici. L'eterogeneità si riflette anche sul livello d'espressione dei diversi recettori. E' importante in questo caso sottolineare l'alta frequenza di una co-espressione dei diversi recettori riscontrata all'interno di un tumore e che questo fenomeno potrebbe svolgere un ruolo importante nella patogenesi. Di fatti, la co-espressione di differenti recettori ErbB è associata ad un fenotipo tumorale più aggressivo e una prognosi peggiore (138). La possibilità di reindirizzare il tropismo di HSV-1 via gH e via gD ha aperto la strada alla progettazione di HSV-1 bispecifici diretti contemporaneamente verso due recettori tumorali, che potrebbero contrattaccare meglio l'eterogeneità delle cellule tumorali rispetto ad un HSV-1 oncolitico diretto contro un unico recettore. Nel caso di una down-regolazione di uno dei due recettori, il virus bispecifico sarebbe ancora in grado di infettare mediante il secondo recettore tumorale. E' stato pertanto generato il virus bispecifico R-805, che porta l'inserzione del scFv-HER2 in gH e l'inserzione del scFv-EGFR nella gD deleta. R-805 è in grado di usare alternativamente HER2 o EGFR e i dati ottenuti dall'analisi della citotossicità cellulare ne hanno dimostrato l'efficacia oncolitica *in vitro*. In particolare, l'attività oncolitica del virus bispecifico *in vitro* si è dimostrata analoga a quella dei virus reindirizzati solo verso HER2 o EGFR.

Prima di proseguire a valutare l'efficacia anti-tumorale *in vivo*, sono state eseguite prove di induzione tumorale della linea di adenocarcinoma colon rettale HT-29 per determinare la capacità di tali cellule di indurre tumori in topi immunodepressi. Essendo i scFv ingegnerizzati nei virus specifici per HER2/EGFR umani, il modello qui utilizzato prevede il xenotrapianto di tumori umani in topi immunodepressi nudi CD-1. In considerazione dei risultati ottenuti negli esperimenti di induzione tumorale, sono in corso esperimenti di efficacia oncolitica *in vivo* sulla linea HT-29. Dati preliminari, indicano che la media delle masse tumorali degli animali trattati con il virus bispecifico risulta essere sempre inferiore rispetto alla media del volume delle masse dei topi trattati con il veicolo. Questi dati preliminari, da validare, suggeriscono che R-805 risulta essere efficace nel rallentamento della proliferazione cellulare della linea HT-29.

5.3 Reindirizzamento di HSV-1 tramite la glicoproteina fusogenica gB

La glicoproteina D è il maggior determinante del tropismo di HSV-1, in quanto il suo legame ad uno dei suoi recettori alternativi (HVEM e nectina1), attiva le glicoproteine a valle gH/gL e gB, che infine, eseguono la fusione con la membrana cellulare (11, 41, 172). Il complesso gH/gL +

gB rappresenta l'apparato di fusione conservato all'interno della famiglia *Herpesviridae*. gH/gL agisce da regolatore positivo nel passaggio di gB alla sua forma attiva per la fusione.

gB è la proteina fusogenica di HSV-1, la cui sequenza è altamente conservata all'interno della famiglia *Herpesviridae* (61). E' una delle glicoproteine essenziali nell'ingresso di HSV-1 ed è coinvolta sia nell'attacco del virus alla superficie cellulare, attraverso l'interazione con l'eparan solfato, che nella fusione con le membrane cellulari. gB è in grado di legare anche tre recettori: PILR α , MAG, NMHC-IIA e B (69-72). Il limitato contributo di questi recettori di gB al tropismo virale nel suo complesso è evidenziato dall'osservazione che eliminando l'interazione di gD con i suoi recettori viene abolito anche l'ingresso del virus in praticamente qualsiasi cellula. Per cui le molecole sopra descritte fungono al massimo come co-recettori, più che come recettori cellulari che determinano il tropismo di HSV-1.

Si è voluto modificare il tropismo di HSV-1 ingegnerizzando un ligando eterologo (in questo caso un scFv-HER2) all'N-terminale di gB per esplorare nuove strategie di reindirizzamento nel disegno di virus herpes simplex oncolitici e, nel contempo, sfruttare le conoscenze apprese dagli studi di reindirizzamento per comprendere più a fondo i meccanismi coinvolti nella penetrazione di HSV-1 nella cellula.

Sono stati generati due virus ricombinanti, R-903 ed R-909, che portano l'inserzione del scFv diretto contro HER2 tra gli aa 43 e 44 di gB. La sequenza di gD è *wt* in R-903 e deleta degli aa 6-38 in R-909. I residui tra 6-38 costituiscono una regione critica per il legame di gD ai suoi recettori naturali nectina1 e HVEM. I risultati riportati in questa tesi, nell'articolo in revisione alla rivista PLOS Pathogens e nel deposito di brevetto europeo EP 16173830.7, dimostrano che entrambi i virus sono reindirizzati a cellule che esprimono HER2 e pertanto l'inserzione di un scFv in gB è in grado di modificare il tropismo cellulare di HSV-1 e definire lo spettro d'ospite del virus. Questo risultato è sorprendente, dato che gB è nota per la sua attività fusogenica, ma non come determinante del tropismo di HSV-1. L'infezione delle cellule J-HER2 ha luogo in assenza dei recettori di gD, o in presenza di gD deleta incapace di legare i recettori naturali. Ne segue che, in questo caso, l'infezione è indipendente dall'attivazione di gD, che parte dal legame ai suoi recettori. Sempre per quanto concerne i meccanismi d'ingresso del virus, in HSV-1 *wt* le integrine $\alpha\beta 6$ o $\alpha\beta 8$ fungono da recettori di HSV-1, legando gH e contribuendo alla sua attivazione (43, 168). I risultati ottenuti dimostrano che l'infezione con il virus R-909 non risente della deplezione delle integrine $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$ e, contrariamente al virus *wt*, non richiede la presenza delle integrine $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$ per portare a termine un'infezione efficiente. E' noto da risultati ottenuti nel laboratorio della Prof.ssa Campadelli che le integrine inducono un cambiamento conformazionale in gH/gL, che risulta nel distacco di gL dall'eterodimero gH/gL (44), uno step nel processo di attivazione di gH/gL. I dati riportati in negli esperimenti descritti

in questa tesi suggeriscono che l'ingresso di R-909 è indipendente dalla integrina β , non porta al distacco di gL e, di conseguenza, l'attivazione di gH mediata dalle integrine non sembra essere un passaggio critico.

Cumulativamente, i dati indicano che nel virus R-909, la cascata di attivazione delle glicoproteine che porta alla attivazione di gB non avviene in maniera canonica nel virus R-909, ovvero non inizia dal legame di gD ai suoi recettori e alla trasmissione del segnale e attivazione delle glicoproteine a valle gH/gL ed infine di gB e non richiede il contributo delle integrine $\alpha\beta 6$ e $\alpha\beta 8$. Nel virus reindirizzato in gB il recettore HER2 attiva direttamente la proteina chimerica gB_{HER2}. Si può concludere che la glicoproteina B chimerica comprende due domini funzionali: il scFv che permette l'attivazione di gB a seguito del legame con l'HER2, e il dominio fusogenico, intrinseco della glicoproteina.

Il blocco dell'infezione di R-909 da anticorpi diretti contro gD è in apparente contraddizione con l'infezione, indipendente dall'attivazione mediata dai recettori di gD, osservata nelle cellule J-HER2, e potrebbe riflettere molteplici funzioni di questa glicoproteina. In aggiunta al ruolo di innesco della cascata di attivazione a seguito del legame ai suoi recettori, abbiamo ipotizzato che gD possa svolgere un ruolo "strutturale" (164). Le glicoproteine infatti si assemblano in complessi anche in assenza dei recettori di gD (167) e la completa assenza di una delle glicoproteine o il legame degli anticorpi, potrebbe influenzare la struttura/stabilità/stechiometria del complesso. In questo progetto di dottorato, si è cercato di fornire evidenze sperimentali al ruolo "strutturale" di gD mediante un saggio di fusione cellula-cellula, utile per studiare separatamente il contributo delle singole glicoproteine durante la penetrazione del virus nella cellula. La fusione cellulare mediata da gB_{HER2}, gH_{HER2} o dalle versioni *wt*, non è rilevabile in totale assenza di gD. Perciò, sebbene la gD *wt* o la gD _{$\Delta 6-38$} non possano essere attivate dal recettore HER2, e perciò non svolgano il ruolo di innesco della fusione, gD non può essere omessa. In conclusione, i risultati forniscono evidenze sperimentali a favore di un ruolo di gD diverso da quello dell'innesco della fusione, verosimilmente a favore del suo ruolo strutturale.

Nella maggior parte dei virus, un'unica o due proteina di membrana mediano il riconoscimento del recettori cellulari e l'esecuzione della fusione (173). La questione che si pone riguardo ad HSV è perché abbia evoluto un sistema multipartito di penetrazione nella cellula. Verosimilmente, il sistema che fa uso di più glicoproteine di superficie permette al virus di sincronizzare l'endocitosi con la cascata di attivazione delle proteine ed evitarne la prematura attivazione. Inoltre il sistema multipartito può garantire un più ampio e diversificato uso dei recettori cellulari (gH lega le integrine, gB le molecole MAG, PILR α e NMHC-IIA e B). Da un punto di vista evoluzionistico, il sistema monopartito potrebbe non assicurare il livello di sofisticazione di un più complesso sistema che coinvolge diverse proteine.

L'inserzione di un ligando eterologo, nel nostro caso un scFv-HER2 di 259 aa, nella proteina di HSV-1 deputata alla fusione, potrebbe avere avuto degli effetti deleteri sull'efficacia di ingresso e replicazione del virus. Per quanto riguarda la replicazione, R-909 cresce a titoli molto simili a quelli del virus reindirizzato tramite gH R-809 e a circa un logaritmo al di sotto del virus reindirizzato tramite gD R-LM113. R-909 genera invece placche d'infezione più grandi rispetto ai virus R-809 ed R-LM113, dimostrando un passaggio cellula-cellula più efficace. L'attività oncolitica *in vitro* del ricombinante R-909 per le linee umane tumorali HER2 positive è molto simile a quella esibita da R-809 e dal wt HSV-1(F). L'inserzione di un ligando eterologo, un scFv-HER2, in gB non ha un impatto negativo sulla replicazione e sul passaggio cellula-cellula di HSV-1.

Nel complesso, i risultati indicano che il reindirizzamento ottenuto con l'ingegnerizzazione della glicoproteina B conferisce ad HSV-1 proprietà molto simili al reindirizzamento conseguito tramite gH, in termini di replicazione virale e attività oncolitica *in vitro*. I risultati sulla chimera gB ottenuti in questo studio espandono e migliorano la strategia nel disegno di HSV-1 oncolitici reindirizzati. Una diretta conseguenza è la possibilità di combinare il reindirizzamento conseguito tramite gB con quello ottenuto via gD o gH, al fine di generare HSV-1 oncolitici in grado di fare fronte all'eterogeneità recettoriale esibita dalle cellule tumorali o di sfruttare la capacità bispecifica del virus ai fini di una coltivazione in cellule non-tumorali. Questa parte sarà discussa in dettaglio nel prossimo paragrafo.

5.4 Coltivazione di un HSV-1 oncolitico in una linea non tumorale

La produzione di un HSV-1 oncolitico in una linea cellulare umana tumorale potrebbe non essere considerato compatibile con la sperimentazione clinica. Sfruttando le recenti osservazioni sulla possibilità di alterare il tropismo cellulare di HSV-1 mediante ingegnerizzazione in gB, oltre a gD, abbiamo ingegnerizzato un virus bispecifico (R-313) in grado di utilizzare alternativamente due recettori, per infettare le cellule tumorali o le cellule produttrici non tumorali. Un reindirizzamento è stato conseguito tramite l'inserzione in gD di un scFv diretto verso HER2, mentre il secondo reindirizzamento è stato conseguito inserendo in gB un peptide di 20 aa derivato dal fattore di trascrizione di lievito GCN4. Parallelamente, è stata generata la linea Vero-GCN4R, che esprime come recettore chimerico un scFv derivato da un anticorpo monoclonale che lega l'epitopo GCN4 con alta affinità (20 pM) (154) fuso con il dominio II, III, TM (transmembrana) e la coda citoplasmatica del recettore nectina1 umana. La linea Vero è stata scelta poiché si tratta di una linea permissiva alle infezioni virali, verosimilmente a causa dei difetti nella produzione di IFN I (170). Inoltre il virus oncolitico T-Vec, approvato nel 2015 negli

USA e nel 2016 in Europa per il trattamento del melanoma in stadio avanzato, è prodotto proprio nella linea Vero per cui è una linea già approvata dalle agenzie regolatorie per la produzione di un virus utilizzato in clinica.

E' possibile, dunque, re-indirizzare HSV-1 a due recettori distinti, i quali possono essere utilizzati indipendentemente l'uno dall'altro. Poiché l'interazione con HER2 è *via* gD, mentre l'interazione con GCN4R avviene tramite gB, i determinanti del tropismo virale sono alternativamente gD o gB, in base al recettore di cui il virus si serve per infettare la particolare tipologia di cellula. La capacità dell'HSV-1 reindirizzato di utilizzare alternativamente il recettore d'interesse *via* gD o gB rende possibile crescere il virus HSV-1 oncolitico reindirizzato in una linea cellulare non tumorale.

Quello che risulta sorprendente in questa tipologia di reindirizzamento è la dimensione del ligando, il peptide GCN4, che è in netto contrasto con quella dei ligandi eterologhi impiegati precedentemente per ottenere il reindirizzamento di HSV-1, quali l'interleuchina-13, l'urochinasasi, e i scFv diretti contro l'EGFR o l'HER2 (126, 129, 133, 174). Questi sono lunghi dai 135 ai 255 aa e caratterizzati da domini strutturali ben definiti. I risultati di questa tesi dimostrano per la prima volta che il reindirizzamento di HSV-1 non richiede l'inserzione di domini proteici strutturalmente complessi ed è sufficiente inserire un peptide lineare di 20 aa in gB, per conferire un nuovo tropismo ad HSV-1. E' ragionevole ipotizzare inoltre, che ligandi di queste dimensioni possano avere accesso ad epitopi più prossimali alla membrana e difficilmente raggiungibili da ligandi, quali un scFv, che presentano un ingombro sterico maggiore.

Alcuni aspetti fondamentali della linea Vero-GCN4R meritano ulteriore approfondimento.

- Dal confronto sulla replicazione virale, i risultati ottenuti dimostrano che l'inserzione del peptide GCN4 si traduce in un aumento della replicazione e passaggio cellula-cellula di R-313 rispetto al parentale R-LM113 nella linea Vero-GCN4R. La linea Vero-GCN4 dimostra proprietà promettenti per la produzione *in vitro* di un HSV-1 oncolitico reindirizzato. Riguardo a questo punto è importante sottolineare che la scelta della via di somministrazione influisce sulla quantità e concentrazione necessaria di virus prodotto. Ad esempio, la dose raccomandata del virus T-Vec, approvato in clinica, è di massimo 4 ml a una concentrazione di 10^8 PFU/ml da iniettare in ciascuna lesione tumorale. La resa virale ottenuta con il sistema delle Vero-GCN4R è compatibile con questa quantità, mentre in vista di una somministrazione sistemica, in cui si ha un notevole abbattimento della carica virale in circolo, la quantità di progenie virale prodotta dalla linea Vero-GCN4R andrebbe ottimizzata.
- Il recettore GCN4R è un recettore artificiale generato fondendo un scFv diretto contro il peptide GCN4 con i domini II, III, TM e la coda citoplasmatica del recettore umano

nectina1. Nectina1 non svolge alcun ruolo nell'ingresso del virus nelle Vero-GCN4 per due motivi. E' accertato che solo il dominio I della nectina1 media l'ingresso di HSV-1, interagendo con la glicoproteina D (49, 175); ne segue che i domini di nectina1 presenti nel recettore chimerico GCN4R non giocano alcun ruolo nell'ingresso di HSV-1. In secondo luogo, come conseguenza della delezione degli aa 6-38 in gD, R-313 non è più in grado di legare nectina1.

- La strategia utilizzata per generare la linea cellulare Vero-GCN4 differisce dai metodi precedentemente utilizzati per generare linee cellulari preposte alla produzione di adenovirus o del virus del morbillo (93, 176). Negli esempi citati, la stessa proteina (la proteina fibra dell'adenovirus e la glicoproteina H del virus del morbillo) era stata modificata ai fini del duplice reindirizzamento. Diversamente, la strategia da noi adottata è stata quella di modificare due differenti glicoproteine, gD per il reindirizzamento verso il recettore tumorale e gB per il reindirizzamento verso il recettore artificiale espresso dalla linea produttrice non tumorale.
- La linea cellulare Vero-GCN4R, in combinazione col reindirizzamento in gB tramite il peptide GCN4R, è una piattaforma che può essere applicata agli HSV-1 oncolitici reindirizzati non solo verso HER2, ma virtualmente verso qualsiasi recettore tumorale d'interesse. Perciò, la linea cellulare Vero-GCN4 potrebbe rappresentare una linea universale per la produzione di HSV-1 oncolitici reindirizzati.

Nell'articolo recentemente accettato per la pubblicazione da Journal of Virology (177) abbiamo presentato i dati relativi alla generazione della linea Vero-GCN4R e al virus R-213, reindirizzato mediante gD verso HER2 e tramite gH verso il recettore artificiale GCN4R. La linea Vero-GCN4R si presenta dunque come possibile linea universale non-tumorale deputata alla produzione di HSV-1 reindirizzati adatti all'uso in clinica, rappresentando un passo in avanti verso la fase traslazionale.

Come considerazione finale, studi di letteratura riportano che le terapie virali oncolitiche risultano in genere più efficaci quando associate alla chemioterapia, radioterapia ed immunoterapia (178, 179). L'immunoterapia oncologica, in particolare rappresenta un approccio promettente alla lotta verso i tumori (180). Gli HSV oncolitici, di fatto, si prestano al trattamento combinato con le terapie tradizionali e l'immunoterapia e l'effetto antitumorale osservato è di natura sinergica (178, 181, 182). Risulta pertanto chiaro che solo un approccio coordinato dei virus oncolitici con differenti terapie potrà portare alla completa eradicazione del tumore.

6. Bibliografia

1. Roizman BaP, P.E. (2013) *Fields Virology 6th Edition*, p. 1802-1808 (Lippincott Williams & Wilkins).
2. Manservigi R, Argnani R, & Marconi P (2010) HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy. *The open virology journal* 4:123-156.
3. Frampton AR, Jr., Goins WF, Nakano K, Burton EA, & Glorioso JC (2005) HSV trafficking and development of gene therapy vectors with applications in the nervous system. *Gene therapy* 12(11):891-901.
4. Andtbacka RH, *et al.* (2015) Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 33(25):2780-2788.
5. Watanabe D (2010) Medical application of herpes simplex virus. *Journal of dermatological science* 57(2):75-82.
6. Whitley RJ & Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *Lancet* 357(9267):1513-1518.
7. Wald A & Corey L (2007) Persistence in the population: epidemiology, transmission. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, eds Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, & Yamanishi KCambridge).
8. Campadelli-Fiume G (2007) The egress of alphaherpesviruses from the cell. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, eds Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, & Yamanishi KCambridge).
9. Schrag JD, Prasad BV, Rixon FJ, & Chiu W (1989) Three-dimensional structure of the HSV1 nucleocapsid. *Cell* 56(4):651-660.
10. Grunewald K, *et al.* (2003) Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 302(5649):1396-1398.
11. Campadelli-Fiume G, *et al.* (2007) The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *Reviews in medical virology* 17(5):313-326.
12. van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G, & van Meer G (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 200(2):831-836.
13. Spear PG, Eisenberg RJ, & Cohen GH (2000) Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology* 275(1):1-8.
14. Kieff ED, Bachenheimer SL, & Roizman B (1971) Size, composition, and structure of the deoxyribonucleic acid of herpes simplex virus subtypes 1 and 2. *Journal of virology* 8(2):125-132.
15. Poffenberger KL & Roizman B (1985) A noninverting genome of a viable herpes simplex virus 1: presence of head-to-tail linkages in packaged genomes and requirements for circularization after infection. *Journal of virology* 53(2):587-595.
16. Deshmane SL, Raengsakulrach B, Berson JF, & Fraser NW (1995) The replicating intermediates of herpes simplex virus type 1 DNA are relatively short. *Journal of neurovirology* 1(2):165-176.
17. Sandri-Goldin RM (2003) Replication of the herpes simplex virus genome: does it really go around in circles? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(13):7428-7429.
18. Roizman BaP, P.E. (2013) *Fields Virology 6th Edition*, p. 1826-1835 (Lippincott Williams & Wilkins).

19. Umbach JL, Nagel MA, Cohrs RJ, Gilden DH, & Cullen BR (2009) Analysis of human alphaherpesvirus microRNA expression in latently infected human trigeminal ganglia. *Journal of virology* 83(20):10677-10683.
20. Honess RW & Roizman B (1974) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins. *Journal of virology* 14(1):8-19.
21. Roizman B, Kozak M, Honess RW, & Hayward G (1975) Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis: evidence for multilevel regulation of herpes simplex 1 RNA and protein synthesis. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 39 Pt 2:687-701.
22. Fruh K, *et al.* (1995) A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* 375(6530):415-418.
23. Sandri-Goldin RM, Goldin AL, Holland LE, Glorioso JC, & Levine M (1983) Expression of herpes simplex virus beta and gamma genes integrated in mammalian cells and their induction by an alpha gene product. *Molecular and cellular biology* 3(11):2028-2044.
24. He B, Gross M, & Roizman B (1997) The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1alpha to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(3):843-848.
25. Chou J, Kern ER, Whitley RJ, & Roizman B (1990) Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. *Science* 250(4985):1262-1266.
26. Nicola AV, McEvoy AM, & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *Journal of virology* 77(9):5324-5332.
27. Gianni T, Gatta V, & Campadelli-Fiume G (2010) {alpha}V{beta}3-integrin routes herpes simplex virus to an entry pathway dependent on cholesterol-rich lipid rafts and dynamin2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(51):22260-22265.
28. Gianni T & Campadelli-Fiume G (2012) alphaVbeta3-integrin relocates nectin1 and routes herpes simplex virus to lipid rafts. *Journal of virology* 86(5):2850-2855.
29. Roizman BaP, P.E. (2013) *Fields Virology 6th Edition*, p. 1836-1856 (Lippincott Williams & Wilkins).
30. Mettenleiter TC (2002) Herpesvirus assembly and egress. *Journal of virology* 76(4):1537-1547.
31. Roizman B, Zhou G, & Du T (2011) Checkpoints in productive and latent infections with herpes simplex virus 1: conceptualization of the issues. *Journal of neurovirology* 17(6):512-517.
32. Ho DY & Mocarski ES (1989) Herpes simplex virus latent RNA (LAT) is not required for latent infection in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86(19):7596-7600.
33. Mador N, Goldenberg D, Cohen O, Panet A, & Steiner I (1998) Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line. *Journal of virology* 72(6):5067-5075.
34. Eisenberg RJ, *et al.* (2012) Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. *Viruses* 4(5):800-832.
35. Spear PG & Longnecker R (2003) Herpesvirus entry: an update. *Journal of virology* 77(19):10179-10185.
36. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, & Spear PG (1991) Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *Journal of virology* 65(3):1090-1098.

37. Laquerre S, *et al.* (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *Journal of virology* 72(7):6119-6130.
38. Oh MJ, Akhtar J, Desai P, & Shukla D (2010) A role for heparan sulfate in viral surfing. *Biochemical and biophysical research communications* 391(1):176-181.
39. Krummenacher C, *et al.* (1998) Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. *Journal of virology* 72(9):7064-7074.
40. Salameh S, Sheth U, & Shukla D (2012) Early events in herpes simplex virus lifecycle with implications for an infection of lifetime. *The open virology journal* 6:1-6.
41. Campadelli-Fiume G & Menotti L (2007) Entry of alphaherpesviruses into the cell. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, eds Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, & Yamanishi K (Cambridge).
42. Chowdary TK, *et al.* (2010) Crystal structure of the conserved herpesvirus fusion regulator complex gH-gL. *Nature structural & molecular biology* 17(7):882-888.
43. Gianni T, Salvioli S, Chesnokova LS, Hutt-Fletcher LM, & Campadelli-Fiume G (2013) alphavbeta6- and alphavbeta8-integrins serve as interchangeable receptors for HSV gH/gL to promote endocytosis and activation of membrane fusion. *PLoS pathogens* 9(12):e1003806.
44. Gianni T, Massaro R, & Campadelli-Fiume G (2015) Dissociation of HSV gL from gH by alphavbeta6- or alphavbeta8-integrin promotes gH activation and virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(29):E3901-3910.
45. Heldwein EE, *et al.* (2006) Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science* 313(5784):217-220.
46. Zhou G & Roizman B (2007) Separation of receptor-binding and profusogenic domains of glycoprotein D of herpes simplex virus 1 into distinct interacting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(10):4142-4146.
47. Krummenacher C, *et al.* (2005) Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *The EMBO journal* 24(23):4144-4153.
48. Carfi A, *et al.* (2001) Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Molecular cell* 8(1):169-179.
49. Di Giovine P, *et al.* (2011) Structure of herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor nectin-1. *PLoS pathogens* 7(9):e1002277.
50. Yoon M, Zago A, Shukla D, & Spear PG (2003) Mutations in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs alter functional interactions with the entry/fusion receptors HVEM, nectin-2, and 3-O-sulfated heparan sulfate but not with nectin-1. *Journal of virology* 77(17):9221-9231.
51. Menotti L, *et al.* (2009) Inhibition of human tumor growth in mice by an oncolytic herpes simplex virus designed to target solely HER-2-positive cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(22):9039-9044.
52. Fusco D, Forghieri C, & Campadelli-Fiume G (2005) The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(26):9323-9328.
53. Connolly SA, Jackson JO, Jardetzky TS, & Longnecker R (2011) Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nature reviews. Microbiology* 9(5):369-381.
54. Cocchi F, *et al.* (2004) The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(19):7445-7450.

55. Gianni T, Amasio M, & Campadelli-Fiume G (2009) Herpes simplex virus gD forms distinct complexes with fusion executors gB and gH/gL in part through the C-terminal profusion domain. *The Journal of biological chemistry* 284(26):17370-17382.
56. Dubin G & Jiang H (1995) Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes. *Journal of virology* 69(7):4564-4568.
57. Foa-Tomasi L, *et al.* (1991) Herpes simplex virus (HSV) glycoprotein H is partially processed in a cell line that expresses the glycoprotein and fully processed in cells infected with deletion or ts mutants in the known HSV glycoproteins. *Virology* 180(2):474-482.
58. Roberts SR, Ponce de Leon M, Cohen GH, & Eisenberg RJ (1991) Analysis of the intracellular maturation of the herpes simplex virus type 1 glycoprotein gH in infected and transfected cells. *Virology* 184(2):609-624.
59. Forrester A, *et al.* (1992) Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *Journal of virology* 66(1):341-348.
60. Fuller AO, Santos RE, & Spear PG (1989) Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *Journal of virology* 63(8):3435-3443.
61. Cooper RS & Heldwein EE (2015) Herpesvirus gB: A Finely Tuned Fusion Machine. *Viruses* 7(12):6552-6569.
62. Zeev-Ben-Mordehai T, *et al.* (2016) Two distinct trimeric conformations of natively membrane-anchored full-length herpes simplex virus 1 glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
63. Backovic M & Jardetzky TS (2009) Class III viral membrane fusion proteins. *Curr Opin Struct Biol* 19(2):189-196.
64. Subramanian RP & Geraghty RJ (2007) Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(8):2903-2908.
65. Gage PJ, Levine M, & Glorioso JC (1993) Syncytium-inducing mutations localize to two discrete regions within the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *Journal of virology* 67(4):2191-2201.
66. Szpara ML, *et al.* (2014) Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *Journal of virology* 88(2):1209-1227.
67. Bender FC, *et al.* (2007) Antigenic and mutational analyses of herpes simplex virus glycoprotein B reveal four functional regions. *Journal of virology* 81(8):3827-3841.
68. Bender FC, Whitbeck JC, Lou H, Cohen GH, & Eisenberg RJ (2005) Herpes simplex virus glycoprotein B binds to cell surfaces independently of heparan sulfate and blocks virus entry. *Journal of virology* 79(18):11588-11597.
69. Satoh T, *et al.* (2008) PILRALpha is a herpes simplex virus-1 entry coreceptor that associates with glycoprotein B. *Cell* 132(6):935-944.
70. Suenaga T, *et al.* (2010) Myelin-associated glycoprotein mediates membrane fusion and entry of neurotropic herpesviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:866-871.
71. Arii J, *et al.* (2010) Non-muscle myosin IIA is a functional entry receptor for herpes simplex virus-1. *Nature* 467(7317):859-862.
72. Arii J, Hirohata Y, Kato A, & Kawaguchi Y (2015) Nonmuscle myosin heavy chain IIb mediates herpes simplex virus 1 entry. *Journal of virology* 89(3):1879-1888.
73. Dolter KE, Goins WF, Levine M, & Glorioso JC (1992) Genetic analysis of type-specific antigenic determinants of herpes simplex virus glycoprotein C. *Journal of virology* 66(8):4864-4873.
74. Eisenberg RJ, *et al.* (1987) Complement component C3b binds directly to purified glycoprotein C of herpes simplex virus types 1 and 2. *Microbial pathogenesis* 3(6):423-

- 435.
75. Russell SJ, Peng KW, & Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30(7):658-670.
76. Cattaneo R, Miest T, Shashkova EV, & Barry MA (2008) Reprogrammed viruses as cancer therapeutics: targeted, armed and shielded. *Nature reviews. Microbiology* 6(7):529-540.
77. Kelly E & Russell SJ (2007) History of oncolytic viruses: genesis to genetic engineering. *Mol Ther* 15(4):651-659.
78. Garber K (2006) China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98(5):298-300.
79. Xia ZJ, *et al.* (2004) [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer* 23(12):1666-1670.
80. Liu BL, *et al.* (2003) ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene therapy* 10(4):292-303.
81. He B, *et al.* (1997) Suppression of the phenotype of gamma(1)34.5- herpes simplex virus 1: failure of activated RNA-dependent protein kinase to shut off protein synthesis is associated with a deletion in the domain of the alpha47 gene. *Journal of virology* 71(8):6049-6054.
82. Naik S & Russell SJ (2009) Engineering oncolytic viruses to exploit tumor specific defects in innate immune signaling pathways. *Expert Opin Biol Ther* 9(9):1163-1176.
83. Metcalf D (1985) The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Cell* 43(1):5-6.
84. Fukuhara H, Ino Y, & Todo T (2016) Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci* 107(10):1373-1379.
85. Matsubara S, *et al.* (2001) A conditional replication-competent adenoviral vector, Ad-OC-E1a, to cotarget prostate cancer and bone stroma in an experimental model of androgen-independent prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 61(16):6012-6019.
86. Parker JN, Bauer DF, Cody JJ, & Markert JM (2009) Oncolytic viral therapy of malignant glioma. *Neurotherapeutics* 6(3):558-569.
87. Markert JM, *et al.* (2000) Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene therapy* 7(10):867-874.
88. Chung RY, Saeki Y, & Chiocca EA (1999) B-myb promoter retargeting of herpes simplex virus gamma34.5 gene-mediated virulence toward tumor and cycling cells. *Journal of virology* 73(9):7556-7564.
89. Kim J, Kim JH, Choi KJ, Kim PH, & Yun CO (2007) E1A- and E1B-Double mutant replicating adenovirus elicits enhanced oncolytic and antitumor effects. *Hum Gene Ther* 18(9):773-786.
90. Waehler R, Russell SJ, & Curiel DT (2007) Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 8(8):573-587.
91. Campadelli-Fiume G, *et al.* (2016) Retargeting Strategies for Oncolytic Herpes Simplex Viruses. *Viruses* 8(3).
92. Even-Desrumeaux K, Baty D, & Chames P (2011) State of the art in tumor antigen and biomarker discovery. *Cancers* 3(2):2554-2596.
93. Nakamura T, *et al.* (2005) Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses. *Nat Biotechnol* 23(2):209-214.
94. Menotti L, Cerretani A, Hengel H, & Campadelli-Fiume G (2008) Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 recombinant capable of entering cells solely via human epidermal growth factor receptor 2. *Journal of virology* 20(October):10153-10161.
95. Boviatsis EJ, *et al.* (1994) Long-term survival of rats harboring brain neoplasms treated

- with ganciclovir and a herpes simplex virus vector that retains an intact thymidine kinase gene. *Cancer Res* 54(22):5745-5751.
96. Chase M, Chung RY, & Chiocca EA (1998) An oncolytic viral mutant that delivers the CYP2B1 transgene and augments cyclophosphamide chemotherapy. *Nat Biotechnol* 16(5):444-448.
 97. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5(4):263-274.
 98. Wong HH, Lemoine NR, & Wang Y (2010) Oncolytic Viruses for Cancer Therapy: Overcoming the Obstacles. *Viruses* 2(1):78-106.
 99. Sova P, *et al.* (2004) A tumor-targeted and conditionally replicating oncolytic adenovirus vector expressing TRAIL for treatment of liver metastases. *Mol Ther* 9(4):496-509.
 100. Dong F, *et al.* (2006) Eliminating established tumor in nu/nu nude mice by a tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand-armed oncolytic adenovirus. *Clin Cancer Res* 12(17):5224-5230.
 101. Ikeda K, *et al.* (1999) Oncolytic virus therapy of multiple tumors in the brain requires suppression of innate and elicited antiviral responses. *Nat Med* 5(8):881-887.
 102. Lamfers ML, *et al.* (2006) Cyclophosphamide increases transgene expression mediated by an oncolytic adenovirus in glioma-bearing mice monitored by bioluminescence imaging. *Mol Ther* 14(6):779-788.
 103. O'Riordan CR, *et al.* (1999) PEGylation of adenovirus with retention of infectivity and protection from neutralizing antibody in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 10(8):1349-1358.
 104. Russell SJ & Peng KW (2008) The utility of cells as vehicles for oncolytic virus therapies. *Curr Opin Mol Ther* 10(4):380-386.
 105. Willmon C, *et al.* (2009) Cell carriers for oncolytic viruses: Fed Ex for cancer therapy. *Mol Ther* 17(10):1667-1676.
 106. Hammer K, *et al.* (2015) Engineered adenoviruses combine enhanced oncolysis with improved virus production by mesenchymal stromal carrier cells. *Int J Cancer*.
 107. Leoni V, *et al.* (2015) Systemic delivery of HER2-retargeted oncolytic-HSV by mesenchymal stromal cells protects from lung and brain metastases. *Oncotarget*.
 108. Varghese S & Rabkin SD (2002) Oncolytic herpes simplex virus vectors for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther* 9(12):967-978.
 109. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, & Coen DM (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252(5007):854-856.
 110. Goldstein DJ & Weller SK (1988) Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *Journal of virology* 62(1):196-205.
 111. Mineta T, Rabkin SD, & Martuza RL (1994) Treatment of malignant gliomas using ganciclovir-hypersensitive, ribonucleotide reductase-deficient herpes simplex viral mutant. *Cancer Res* 54(15):3963-3966.
 112. MacLean AR, ul-Fareed M, Robertson L, Harland J, & Brown SM (1991) Herpes simplex virus type 1 deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence-related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene 1 and the 'a' sequence. *J Gen Virol* 72 (Pt 3):631-639.
 113. Rampling R, *et al.* (2000) Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. *Gene therapy* 7(10):859-866.
 114. Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD, & Martuza RL (1995) Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nat Med* 1(9):938-943.
 115. Cozzi PJ, *et al.* (2001) Intravesical oncolytic viral therapy using attenuated, replication-

- competent herpes simplex viruses G207 and Nv1020 is effective in the treatment of bladder cancer in an orthotopic syngeneic model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15(7):1306-1308.
116. Toda M, Rabkin SD, Kojima H, & Martuza RL (1999) Herpes simplex virus as an in situ cancer vaccine for the induction of specific anti-tumor immunity. *Hum Gene Ther* 10(3):385-393.
 117. Cassady KA, Haworth KB, Jackson J, Markert JM, & Cripe TP (2016) To Infection and Beyond: The Multi-Pronged Anti-Cancer Mechanisms of Oncolytic Viruses. *Viruses* 8(2).
 118. Todo T, Martuza RL, Rabkin SD, & Johnson PA (2001) Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11):6396-6401.
 119. Shen Y & Nemunaitis J (2006) Herpes simplex virus 1 (HSV-1) for cancer treatment. *Cancer Gene Ther* 13(11):975-992.
 120. Todo T (2008) "Armed" oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh Migr* 2(3):208-213.
 121. Wong RJ, *et al.* (2001) Cytokine gene transfer enhances herpes oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *Hum Gene Ther* 12(3):253-265.
 122. Tahara H, Lotze MT, Robbins PD, Storkus WJ, & Zitvogel L (1995) IL-12 gene therapy using direct injection of tumors with genetically engineered autologous fibroblasts. *Hum Gene Ther* 6(12):1607-1624.
 123. Ilkow CS, Swift SL, Bell JC, & Diallo JS (2014) From scourge to cure: tumour-selective viral pathogenesis as a new strategy against cancer. *PLoS pathogens* 10(1):e1003836.
 124. Campadelli-Fiume G, Menotti L, Avitabile E, & Gianni T (2012) Viral and cellular contributions to herpes simplex virus entry into the cell. *Curr Opin Virol* 2(1):28-36.
 125. Laquerre S, Anderson DB, Stolz DB, & Glorioso JC (1998) Recombinant herpes simplex virus type 1 engineered for targeted binding to erythropoietin receptor-bearing cells. *Journal of virology* 72(12):9683-9697.
 126. Zhou G & Roizman B (2006) Construction and properties of a herpes simplex virus 1 designed to enter cells solely via the IL-13alpha2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(14):5508-5513.
 127. Jackson C, Browell D, Gautrey H, & Tyson-Capper A (2013) Clinical Significance of HER-2 Splice Variants in Breast Cancer Progression and Drug Resistance. *International journal of cell biology* 2013:973584.
 128. Gajria D & Chandarlapaty S (2011) HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert review of anticancer therapy* 11(2):263-275.
 129. Menotti L, Cerretani A, & Campadelli-Fiume G (2006) A herpes simplex virus recombinant that exhibits a single-chain antibody to HER2/neu enters cells through the mammary tumor receptor, independently of the gD receptors. *Journal of virology* 80(11):5531-5539.
 130. Carter P, *et al.* (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(10):4285-4289.
 131. Nanni P, *et al.* (2013) Preclinical Therapy of Disseminated HER-2(+) Ovarian and Breast Carcinomas with a HER-2-Retargeted Oncolytic Herpesvirus. *PLoS pathogens* 9(1):e1003155.
 132. Gambini E, *et al.* (2012) Replication-competent herpes simplex virus retargeted to HER2 as therapy for high-grade glioma. *Mol Ther* 20(5):994-1001.
 133. Uchida H, *et al.* (2013) Effective treatment of an orthotopic xenograft model of human glioblastoma using an EGFR-retargeted oncolytic herpes simplex virus. *Mol Ther* 21(3):561-569.
 134. Citri A & Yarden Y (2006) EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev*

- Mol Cell Biol* 7(7):505-516.
135. Normanno N, *et al.* (2006) Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene* 366(1):2-16.
 136. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Maiello MR, & Salomon DS (2003) Target-based agents against ErbB receptors and their ligands: a novel approach to cancer treatment. *Endocr Relat Cancer* 10(1):1-21.
 137. Abd El-Rehim DM, *et al.* (2004) Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *British journal of cancer* 91(8):1532-1542.
 138. DiGiovanna MP, *et al.* (2005) Relationship of epidermal growth factor receptor expression to ErbB-2 signaling activity and prognosis in breast cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23(6):1152-1160.
 139. Baselga J & Swain SM (2009) Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 9(7):463-475.
 140. Burgess AW, *et al.* (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular cell* 12(3):541-552.
 141. Kimura H, *et al.* (2007) Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci* 98(8):1275-1280.
 142. Ennis BW, Lippman ME, & Dickson RB (1991) The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer investigation* 9(5):553-562.
 143. Rusnak DW, *et al.* (2001) The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 1(2):85-94.
 144. Rusnak DW, *et al.* (2001) The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res* 61(19):7196-7203.
 145. Gutierrez C & Schiff R (2011) HER2: biology, detection, and clinical implications. *Archives of pathology & laboratory medicine* 135(1):55-62.
 146. Callahan R & Hurvitz S (2011) Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: Current management of early, advanced, and recurrent disease. *Current opinion in obstetrics & gynecology* 23(1):37-43.
 147. Negro A, Brar BK, & Lee KF (2004) Essential roles of Her2/erbB2 in cardiac development and function. *Recent progress in hormone research* 59:1-12.
 148. Hynes NE & Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5(5):341-354.
 149. Boero S, *et al.* (2015) Analysis of in vitro ADCC and clinical response to trastuzumab: possible relevance of FcgammaRIIIA/FcgammaRIIA gene polymorphisms and HER-2 expression levels on breast cancer cell lines. *Journal of translational medicine* 13:324.
 150. Wolff AC, *et al.* (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* 131(1):18-43.
 151. Narayan M, *et al.* (2009) Trastuzumab-induced HER reprogramming in "resistant" breast carcinoma cells. *Cancer Res* 69(6):2191-2194.
 152. Cocchi F, Menotti L, Mirandola P, Lopez M, & Campadelli-Fiume G (1998) The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin subfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a bona fide receptor for herpes simplex virus types 1 and 2 in human cells. *Journal of virology* 72(12):9992-10002.
 153. Menotti L, *et al.* (2000) The murine homolog of human-Nectin1 δ serves as a species non-specific mediator for entry of human and animal α herpesviruses in a pathway independent of a detectable binding to gD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(9):4867-4872.

154. Zahnd C, *et al.* (2004) Directed in vitro evolution and crystallographic analysis of a peptide-binding single chain antibody fragment (scFv) with low picomolar affinity. *The Journal of biological chemistry* 279(18):18870-18877.
155. Sidhu SS, *et al.* (2004) Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J Mol Biol* 338(2):299-310.
156. Ejercito PM, Kieff ED, & Roizman B (1968) Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* 2(3):357-364.
157. Tanaka M, Kagawa H, Yamanashi Y, Sata T, & Kawaguchi Y (2003) Construction of an excisable bacterial artificial chromosome containing a full-length infectious clone of herpes simplex virus type 1: viruses reconstituted from the clone exhibit wild-type properties in vitro and in vivo. *Journal of virology* 77(2):1382-1391.
158. Showalter SD, Zweig M, & Hampar B (1981) Monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 proteins, including the immediate-early protein ICP 4. *Infect Immun* 34(3):684-692.
159. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, & Copeland NG (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res* 33(4):e36.
160. Brunetti CR, *et al.* (1995) Role of mannose-6-phosphate receptors in herpes simplex virus entry into cells and cell-to-cell transmission. *Journal of virology* 69(6):3517-3528.
161. Pertel PE, Fridberg A, Parish ML, & Spear PG (2001) Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279(1):313-324.
162. Gianni T, Martelli PL, Casadio R, & Campadelli-Fiume G (2005) The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane alpha-helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the Herpesviridae family. *Journal of virology* 79(5):2931-2940.
163. Atanasiu D, *et al.* (2013) Regulation of herpes simplex virus gB-induced cell-cell fusion by mutant forms of gH/gL in the absence of gD and cellular receptors. *mBio* 4(2).
164. Gatta V, Petrovic B, & Campadelli-Fiume G (2015) The Engineering of a Novel Ligand in gH Confers to HSV an Expanded Tropism Independent of gD Activation by Its Receptors. *PLoS pathogens* 11(5):e1004907.
165. Kao J, *et al.* (2009) Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 4(7):e6146.
166. Mullen P (2004) The use of Matrigel to facilitate the establishment of human cancer cell lines as xenografts. *Methods in molecular medicine* 88:287-292.
167. Atanasiu D, *et al.* (2007) Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(47):18718-18723.
168. Campadelli-Fiume G, Collins-McMillen D, Gianni T, & Yurochko AD (2016) Integrins as Herpesvirus Receptors and Mediators of the Host Signalosome. *Annual review of virology* 3(1):215-236.
169. Reisoli E, *et al.* (2012) Efficacy of HER2 retargeted herpes simplex virus as therapy for high-grade glioma in immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* 19(11):788-795.
170. Desmyter J, Melnick JL, & Rawls WE (1968) Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *Journal of virology* 2(10):955-961.
171. Zhou G & Roizman B (2005) Characterization of a recombinant herpes simplex virus 1 designed to enter cells via the IL13Ralpha2 receptor of malignant glioma cells. *Journal of virology* 79(9):5272-5277.
172. Avitabile E, Forghieri C, & Campadelli-Fiume G (2009) Cross talk among the glycoproteins involved in herpes simplex virus entry and fusion: the interaction between gB and gH/gL does not necessarily require gD. *Journal of virology* 83(20):10752-10760.

173. Harrison SC (2015) Viral membrane fusion. *Virology* 479-480:498-507.
174. Kamiyama H, Zhou G, & Roizman B (2006) Herpes simplex virus 1 recombinant virions exhibiting the amino terminal fragment of urokinase-type plasminogen activator can enter cells via the cognate receptor. *Gene therapy* 13(7):621-629.
175. Cocchi F, *et al.* (1998) The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(26):15700-15705.
176. Douglas JT, *et al.* (1999) A system for the propagation of adenoviral vectors with genetically modified receptor specificities. *Nat Biotechnol* 17(5):470-475.
177. Leoni V, *et al.* (2017) A strategy for cultivation of retargeted oncolytic HSVs in non-cancer cells. *Journal of virology*.
178. Simpson GR, Relph K, Harrington K, Melcher A, & Pandha H (2016) Cancer immunotherapy via combining oncolytic virotherapy with chemotherapy: recent advances. *Oncolytic virotherapy* 5:1-13.
179. Sampath P & Thorne SH (2015) Novel therapeutic strategies in human malignancy: combining immunotherapy and oncolytic virotherapy. *Oncolytic virotherapy* 4:75-82.
180. Farkona S, Diamandis EP, & Blasutig IM (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC medicine* 14:73.
181. Farrell CJ, *et al.* (2008) Combination immunotherapy for tumors via sequential intratumoral injections of oncolytic herpes simplex virus 1 and immature dendritic cells. *Clin Cancer Res* 14(23):7711-7716.
182. Dai MH, *et al.* (2010) Synergistic action of oncolytic herpes simplex virus and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines. *The British journal of surgery* 97(9):1385-1394.